

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología molecular

**Papel de las proteínas RuvA, RuvB y
RecU en las etapas tempranas y tardías
de la recombinación homóloga en
*Bacillus subtilis***

Tesis doctoral

Cristina Cañas Muñiz

Madrid 2011

Memoria presentada por Cristina Cañas Muñiz para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Prof. Juan Carlos Alonso Navarro y la Dra. Silvia Ayora Hirsch.

DNA homologous recombination is an essential process required for the generation of biological diversity, the maintenance of genomic stability after DNA-damage, and the restart of stalled replication forks. After end processing and as a result of the strand invasion activity of the RecA recombinase, a recombination intermediate (termed Holliday junction, HJ) is generated. This intermediate is formed by two recombining DNA molecules linked by a crossover. In *B. subtilis* the complex that processes the HJ in order to obtain two independent DNA molecules (monomeric chromosomes) is composed by the RuvAB translocase and the RecU HJ resolvase. Mutations in the *ruvA*, *ruvB* or *recU* genes (epistatic group ϵ) render cells very sensitive to the exposition of a DNA damaging agent, as methylmethane sulfonate (MMS).

The active RecU resolving enzyme, which is a dimer in solution, consists of two monomers of 206 residues. The protein contains a large and flexible N-terminus (residues 1-33), which is responsible of the stability of the HJ-RecU complex and the interaction with RuvB and contains the highly conserved NRGM tetrad. The residue R31 of the NRGM tetrad is directly implicated in the interaction between both proteins. The N-terminus is essential for the catalytic activity of RecU and for proper chromosome segregation. The expression of *recU*, which is in the *recU-ponA* operon, is regulated by the σ^M regulon. The expression of *recU* is induced under different membrane stresses, included addition of vancomycin. In contrast, the *recU* expression is not induced during the SOS response.

RecU is able to modulate RecA activities, which suggests a role in early steps of the HR process. In this work, we have been characterized two mutants of RecU, *recU56* and *recU71*, which promote resolution of HJs, but do not promote RecA modulation. This RecU activity plays an important role *in vivo*, since both mutants are very sensitive to MMS and are impaired in plasmid transformation. During plasmid transformation, which is a RecA-independent process, RecU would modulate the formation of RecA presynaptic filaments that might be deleterious in a $\Delta recU$ context. By this way, the absence of RecA, suppresses the RecU requirement during plasmid transformation. A RecU-HJ model was proposed. In this model the stalk region, which is highly conserved among RecU proteins, would be accommodated in the central hole formed in the HJ. Two aromatic residues, Y80 and F81, were directly implicated in the specific recognition of HJ DNA and HJ distortion. RecUY80A and RecUF81A failed to interact and modulate RecA activities, which supports the idea that the stalk region is implicated in RecA interaction. Both activities RecA modulation and HJ binding, are mutually exclusive, and once RecU interacts with a HJ, does not interact with RecA. RuvA and RuvB catalyze the HJ branch migration. RuvA, which forms tetramers u octamers and binds at the centre of the HJ, stimulates the ATPase activity of RuvB and it is essential for helicase activity. RecU and RuvB interact *in vitro*, and form two types of complexes at the center of the HJ as detected by AFM. RuvB stimulates the RecU HJ cleavage favouring a symmetrical resolution, which is essential for the proper segregation of the two DNA molecules. RuvA is able to displace RecU from the RecU-RuvB-HJ complex and to inhibit RecU HJ cleavage. However the branch migration activity of RuvAB is needed to reach the RecU recognition sequence at the junction point. If RuvA is present at the moment of the HJ resolution catalyzed by RecU remains unclear.

ABREVIATURAS

Ac:	ácido
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNcs:	ADN cadena sencilla
ADNds:	ADN cadena doble
Ap:	Ampicilina
ARN:	ácido ribonucleico
ATP:	adenosina trifosfato
BSA:	seroalbumina bovina
CR:	centros de reparación de ADN
css:	ADNcircular de cadena sencilla
cm:	circulo mellado
cse:	ADN circular superenrollado
DAP:	Acido Diaminopimérico
DAPI:	4, 6- diamidina-2-fenilindol dihidroclorhídrico
dATP:	deoxiadenosina trifosfato
dPAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
DSS:	disuccinimidil suberato
DTT:	ditiotreitól
HJ:	estructura de Holliday
K _{app} :	cantidad de proteína necesario para obtener la mitad del ADN acomplexado
KDa:	Kilodaltons
Kb:	Kilobases
LB:	medio de cultivo Luria Bertani
ldc:	ADN lineal de doble cadena
ma:	moléculas anilladas
Min:	minuto
MMS:	metilmetano sulfonato
ndPAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante
Ni-NTA:	matriz de Níquel

Abreviaturas

Nt:	núcleotido
pb:	pares de bases
PEI:	polietilenimina
pi:	producto intermediario
PVDF:	membrana de polivinilideno difluórico
RH:	recombinación homóloga
SA:	sulfato amónico
SDS:	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TA:	Tris acetato
TAE:	Tris acetato EDTA
TB:	Tris borato
TBE:	Tris borato EDTA
V:	Voltios

INDICE

INTRODUCCION	3
1. El proceso de recombinación homóloga	3
1.1. Etapas de la recombinación homóloga	4
1.1.1. Pre-sinapsis: generación del sustrato de recombinación	4
1.1.2. Sinapsis: búsqueda de homología e intercambio de cadenas	5
1.1.3. Post-sinapsis: migración y resolución de las estructuras de Holliday	6
1.2. Restablecimiento de horquillas de replicación paradas mediante recombinación homóloga	7
1.2.1. Regresión de la horquilla de replicación	7
1.2.2. Vías de restablecimiento de la replicación	8
2. Recombinación homóloga en <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.1. Cargado del replisoma en la horquilla de replicación	13
2.2. Papel de proteínas de recombinación homóloga en competencia natural en <i>B. subtilis</i>	13
3. Resolución de los intermediarios de Holliday	14
3.1. El complejo translocasa: las proteínas RuvA y RuvB	14
3.1.1. RuvA	14
3.1.2. RuvB	17
3.1.3. Actividad de complejo RuvAB	18
3.2. Las resolvasas de estructuras de Holliday	20
3.2.1. La resolvasa RecU de <i>B. subtilis</i>	22
3.2.1.1. Estructura	23
3.2.1.2. Función	25
3.3. Conexión entre el proceso de migración de ramas y resolución	
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	35
1. Materiales	35
1.1. Cepas	35
1.2. Reactivos y materiales	35
1.3. Tampones	37
2. Métodos	37
2.1. Manipulación de células	37
2.1.1. Obtención de células competentes	37
2.1.2. Transformación bacteriana	38
2.2. Manipulación de ADN	38
2.2.1. Purificación y cuantificación de ADN	38
2.2.2. Plásmidos	38
2.2.3. Marcaje radiactivo de ADN	39
2.2.4. Construcción de HJs sintéticas	39
2.2.5. Construcción <i>in vivo</i> de HJs	40

2.2.6. Mutagénesis dirigida	41
2.3. Obtención de proteínas	41
2.3.1. Sobreexpresión de proteínas	41
2.3.2. Purificación de proteínas	42
2.3.3. Identificación de proteínas y determinación de la masa molecular	43
2.4. Ensayos <i>in vivo</i>	43
2.4.1. Viabilidad frente a MMS	43
2.4.3. Microscopía óptica de fluorescencia	44
2.4.4. Inmunodetección de la expresión de la proteína RecU <i>in vivo</i> y cálculo de la vida media	44
2.5. Ensayos <i>in vitro</i>	44
2.5.1. Ensayos de unión a HJs	44
2.5.2. Ensayos de corte de HJs	45
2.5.3. Ensayos de distorsión de HJs	45
2.5.4. Ensayos de unión a filtros de nitrocelulosa	46
2.5.5. Ensayos de renaturalización del ADN	46
2.5.6. Ensayos de migración de ramas de HJs	47
2.5.7. Medida de la actividad nATPasa	47
2.5.8. Ensayos de intercambio de cadenas	47
2.5.9. Ensayos de interacción proteína – proteína	48
2.5.10. Microscopía de fuerzas atómicas	48
RESULTADOS	52
A. ANALISIS GENÉTICO Y BIOQUIMICO DE LA RESOLVASA RecU	52
1. Análisis de la expresión del gen de <i>recU</i>	51
1.1. En <i>B. subtilis</i> la proteína RecU se sintetiza como un polipéptido de 23,9 kDa	51
1.2. La síntesis de RecU aumenta en situaciones de estrés sobre la membrana celular y no durante la respuesta SOS	52
2. Papel de la región N-terminal en la actividad catalítica de RecU y en interacción con RuvB	53
2.1. La región N-terminal es esencial para la reparación del ADN por recombinación homóloga	53
2.2. La región N-terminal se requiere para la actividad de corte de RecU	55
2.3. La región N-terminal está implicada en la interacción con RuvB	57
3. La región del tallo está implicada en la interacción con RecA: papel de RecU en etapas tempranas de la recombinación homóloga	59
3.1. Aislamiento de mutantes de <i>recU</i> afectados en las etapas tempranas de la recombinación	59
3.2. Mutaciones en los residuos K56 y R71 de la región del tallo dan lugar a un defecto en reparación por recombinación homóloga	60
3.3. RecUK56A y RecUR71A unen y cortan HJs	61

3.4. La región del tallo está implicada en la interacción con RecA	63
3.4.1. RecUK56A y RecUR71A no inhiben la actividad dATPasa dependiente de ADNcs de RecA	63
3.4.2. RecUK56A y RecU71A no inhiben la actividad de intercambio de cadenas dependiente de dATP de RecA	64
3.4.3. RecUK56A y RecUR71A no interaccionan con RecA	65
4. Papel de la región del tallo en el reconocimiento y distorsión de las estructuras de Holliday	67
4.1. Mutaciones en los residuos Y80 y F81 dan lugar a un fenotipo complejo	67
4.2. El tallo determina la especificidad de unión de RecU a las HJs y es esencial para la distorsión y resolución	69
4.2.1. Especificidad de unión y estabilidad del complejo ADN-proteína	69
4.2.2. Resolución de HJs e interacción con RuvB	71
4.2.3. Distorsión de HJs	72
4.2.4. RecUY80A y RecUF81A no interaccionan con RecA	75
4.3. La interacción de RecU con la HJ impide la interacción con RecA	76
B. INTERACCION FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEINAS DEL RESOLVASOMA	78
1. Actividad bioquímica de RuvA y RuvB	78
1.1. Estado oligomérico de RuvA y unión de RuvA a las HJs	78
1.2. Actividad ATPasa de RuvB en presencia de RuvA	82
1.3. Actividad helicasa del complejo RuvAB	83
1.4. Formación del complejo RuvAB-HJ <i>in vitro</i>	83
2. Interacción funcional entre RuvAB y RecU	85
2.1. Formación del complejo RuvA-RuvB-RecU <i>in vitro</i>	85
2.2. Unión de RecU a HJs en presencia de RuvA y RuvB	86
2.2. Resolución de HJs por RecU en presencia de RuvA y RuvB	90
DISCUSION	97
1. Análisis funcional de la resolvasa RecU en reparación por recombinación homóloga	97
1.1. Análisis de la expresión del gen de recU	97
1.2. RecU está implicada en etapas tempranas de la recombinación homóloga	98
1.3. La región N-terminal de RecU es esencial para la unión estable a HJs y para la interacción con RuvB	100
1.4. La región del tallo es esencial para el reconocimiento y distorsión de las HJs	101
2. Análisis del resolvasoma en <i>Bacillus subtilis</i>	104
2.1. Caracterización del complejo translocasa RuvAB	104

Indice

2.2. RuvA inhibe la reacción de corte de RecU e inhibe la estimulación que RuvB ejerce sobre RecU	105
2.3. RecU y RuvB interaccionan en el punto de entrecruzamiento de la HJ	106
2.4. Requerimiento de la actividad de migración de ramas en la resolución de HJs	106
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	131

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de recombinación homóloga	4
Figura 2.	Restablecimiento de una horquilla de replicación mediante corte de la HJ	8
Figura 3.	Orden temporal de ensamblaje de proteínas durante la reparación de DSBs en <i>B. subtilis</i>	10
Figura 4.	Alineamiento de secuencias de las proteínas <i>BsuRuvA</i> , <i>ThRuvA</i> y <i>EcoRuvA</i>	15
Figura 5.	Estructura de RuvA de <i>E. coli</i>	15
Figura 6.	Estructura de RuvA en complejo con la HJ	16
Figura 7.	Estructura de RuvB	17
Figura 8.	Complejo RuvAB	19
Figura 9.	Árbol de las resolvasas	21
Figura 10.	Alineamiento de secuencias de la región N terminal de la familia RecU	23
Figura 11.	Estructura cristalina del dímero de RecU	24
Figura 12.	Modelo de unión de RecU a la estructura de Holliday	25
Figura 13.	Modelo de interacción de RuvA, RuvB y RuvC sobre la HJ	27
Figura 14.	Detección <i>in vivo</i> de la síntesis de RecU	51
Figura 15.	Análisis de la inducción en la síntesis de RecU por adición de vancomicina y MMC	53
Figura 16.	Curvas de supervivencia de las cepas mutantes en la región N-terminal de RecU tras la exposición a 10 mM de MMS	54
Figura 17.	Segregación de nucleoides en cepas mutantes en la región N-terminal de RecU	55
Figura 18.	Especificidad de unión y capacidad de corte de HJ de las variantes de RecU en la región N-terminal	56
Figura 19.	Interacción entre RuvB y las variantes de RecU de la región N-terminal	58

Figura 20.	Segregación cromosomal y defecto en la reparación de ADN de $\Delta recU$, <i>recU56</i> y <i>recU71</i>	61
Figura 21.	Unión y resolución de HJs e interacción con RuvB de los mutantes RecUK56A y RecUR71A	62
Figura 22.	Efecto de RecUK56A o RecUR71A en la actividad de hidrólisis de dATP catalizada por RecA	63
Figura 23.	Actividad de anillamiento de ADNcs de RecUK56A y RecUR71A	64
Figura 24.	Efecto de RecUK56A y RecUR71A en la actividad de intercambio de cadenas de RecA	65
Figura 25.	Análisis de la interacción de los mutantes RecUK56A y RecUR71A con RecA	66
Figura 26.	Localización de los residuos Y80 y F81 en el modelo de interacción del dímero de RecU con la HJ	67
Figura 27.	Defecto en segregación y viabilidad de los mutantes <i>recU80</i> y <i>recU81</i>	68
Figura 28.	Ensayo de dimerización de los mutantes RecUY80A y RecUF81A	69
Figura 29.	Unión a HJs y estabilidad del complejo ADN-proteína en los mutantes RecUY80A y RecUF81A	70
Figura 30.	Resolución de HJs de los mutantes RecUY80A y RecUF81A e interacción con RuvB	71
Figura 31.	Análisis de la interacción de los mutantes RecUY80A, RecUF81A con RuvB	72
Figura 32.	Estructuras de Holliday digeridas y patrón de migración en presencia de $MgCl_2$ y EDTA	73
Figura 33.	Conformación de la estructura de Holliday unida a RecU y a las variantes RecUY80 y RecUF81A	74
Figura 34.	Interacción de los mutantes RecUY80A y RecUF81A con RecA	75
Figura 35.	RecU no interacciona con RecA cuando está unida a HJ	76

Figura 36.	Estado oligomérico de RuvA	78
Figura 37.	Unión de RuvA a HJs	79
Figura 38.	Generación y visualización por AFM de HJs largas	80
Figura 39.	Unión de RuvA a estructuras-X	81
Figura 40.	Actividad ATPasa de RuvB	82
Figura 41.	Actividad helicasa de RuvAB	83
Figura 42.	Unión del complejo RuvAB a HJs	84
Figura 43.	Entrecruzamiento de las proteínas RuvA, RuvB y RecU con DSS	85
Figura 44.	Unión de RuvA y RecU a HJs	86
Figura 45.	Unión de RecU a HJs en presencia de RuvA y RuvB	87
Figura 46.	Visualización del complejo RecU-RuvB-HJ mediante AFM	89
Figura 47.	RuvA inhibe el corte de Hjs llevado a cabo por RecU	90
Figura 48.	Resolución de Hjs por RecU en presencia de RuvB	91
Figura 49.	Resolución de HJs por RecU en presencia de RuvA y RuvB	92
Figura 50.	Resolución de estructuras-X por RecU en presencia de RuvA y RuvB	93
Figura 51.	Residuos conservados en la región del tallo y su localización en la estructura de rayos X de <i>BstRecU</i>	99
Figura 52.	Comparación de estructuras entre RecU y Hjc	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Genes implicados en recombinación y grupos epistáticos en <i>B. subtilis</i>	9
Tabla 2.	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 3.	Cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	35
Tabla 4.	Reactivos y materiales	35
Tabla 5.	Tampones de reacción	37
Tabla 6.	Plásmidos	38
Tabla 7.	Oligonucleótidos para la construcción de HJs cortas	40
Tabla 8.	Medida de la eficiencia de transformación plasmídica y cromosomal en cepas de <i>B. subtilis</i>	60

INTRODUCCION

En las células es frecuente la generación de lesiones en el ADN debido a agentes exógenos (radiaciones ionizantes o agentes químicos) o éstas se pueden producir de forma espontánea durante la replicación del ADN (por radicales libres, incorporación de bases erróneas, etc). Todas estas lesiones, si no son reparadas, pueden producir directa o indirectamente roturas en la doble cadena de ADN (DSBs, “*double strand breaks*”) (Michel *et al.* 1997; Kuzminov 1999).

Existen diversas vías de reparación dependiendo del tipo de daño que se genere sobre el ADN. Cuando sólo se daña una de las cadenas de ADN, se puede utilizar la otra como molde. Para ello existen varios mecanismos específicos que eliminan los nucleótidos dañados o incorrectos, como son: reparación por escisión de nucleótidos (NER, “*nucleotide excision repair*”), reparación por escisión de bases (VER, “*base excision repair*”) o reparación de apareamientos erróneos (MMR, “*mismatch repair*”) (Cromie and Leach 2000). Si los daños no se reparan mediante estos mecanismos, pueden llegar a generar zonas de cadena sencilla (“*single strand gaps*”) o DSBs. Un DSB es letal para la célula. La reparación de DSBs incluye diversos mecanismos, como son: recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, “*non-homologous end joining*”) y (Pastink and Lohman 1999). Todos estos mecanismos de reparación se han conservado en la evolución, pero la contribución de cada uno de ellos en la reparación de DSBs difiere dependiendo del organismo que se estudie. Mientras que la RH tiene un papel mayoritario en la reparación de DSBs en procariotas, actúa con menor frecuencia y se restringe a la etapa de replicación en eucariotas superiores, donde los daños son reparados por NHEJ en el resto de las etapas del ciclo celular (Critchlow and Jackson 1998). La maquinaria de NHEJ también se ha encontrado en eucariotas inferiores como la levadura *Sccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe* (Feldmann *et al.* 1996; Manolis *et al.* 2001) y posteriormente en bacterias, aunque en éstas tiene un papel minoritario (Weller *et al.* 2002). Este trabajo se centrará en el estudio de las etapas iniciales y finales del proceso de recombinación homóloga como sistema de reparación de DSBs.

1. El proceso de recombinación homóloga

La RH es el proceso por el cual se produce un intercambio genético entre dos moléculas de ADN que comparten una región extensa de homología. La RH tiene diversas funciones, ya que además de ser un sistema de reparación básico en procariotas, también participa en la primera división celular meiótica en los eucariotas, asegurando la correcta segregación de los cromosomas. Además de estas funciones, juega un importante papel en el mantenimiento de la diversidad genética de todos los organismos.

1.1. Etapas de la recombinación homóloga

Estudios genéticos y bioquímicos han llevado a dividir el proceso en tres etapas principales (Fig. 1; revisado por Kowalczykowski, 1994). El proceso se ha descrito con detalle en *Escherichia coli* y se detalla a continuación, pero el mecanismo general se conserva desde bacterias a eucariotas (San Filippo *et al.* 2008). En la primera etapa de iniciación o pre-sinapsis se forma el sustrato de recombinación para la acción de la recombinasa. En la segunda etapa, la sinapsis, se produce la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas. Y por último en la tercera etapa denominada post-sinapsis se produce la migración y la resolución de los intermediarios.

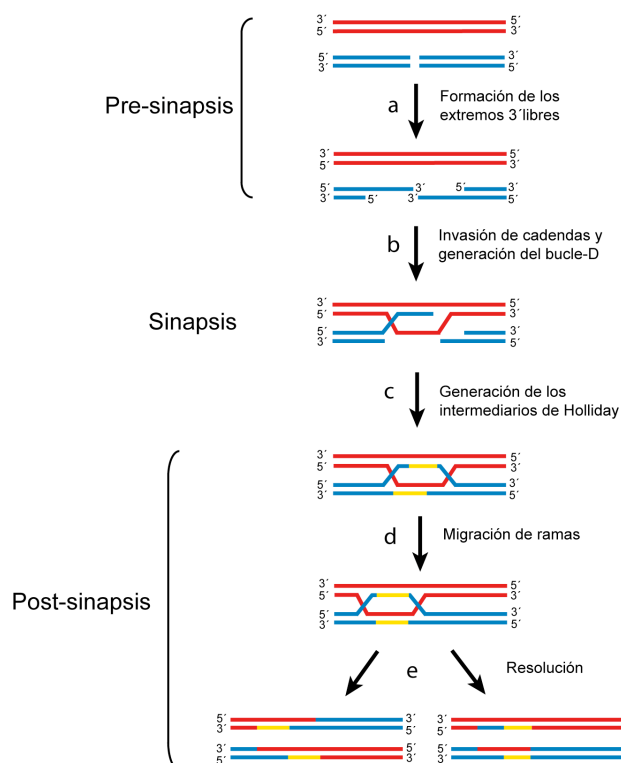


Figura 1. Proceso de recombinación homóloga.

Las dos moléculas de ADN se muestran una de color rojo y otra de color azul. **(a)** La acción de helicasas y nucleasas del complejo RecBCD o RecFOR - RecQJ produce el extremo 3' libre necesario para el cargado de RecA, que lleva a cabo la invasión de la cadena en el ADNcd homólogo, con lo que se forma un bucle D **(b)**, que mediante ligación de extremos y la extensión de la cadena que invade da lugar a una estructura de Holliday **(c)**. El complejo RuvAB produce la migración de ramas **(d)** y la resolvasa RuvC resuelve la HJ en dos productos de recombinación distintos **(e)**.

1.1.1. Pre-sinapsis: generación del sustrato de recombinación

La proteína RecN tendría un papel esencial en la reparación de DSBs vía RH (Kosa *et al.* 2004), aunque se desconoce la actividad concreta de la proteína porque no se ha podido purificar (Grove *et al.* 2009). Una vez reconocido el daño, el proceso comienza con la generación del sustrato de recombinación, es decir, un ADN de cadena sencilla (ADNcs) con un extremo 3' libre, necesario para el cargado de la recombinasa RecA en bacterias o Rad51 en eucariotas, en la siguiente etapa. El procesamiento de extremos tiene lugar en dos pasos. El complejo RecBCD, que tiene actividad nucleasa y helicasa genera una región de cadena sencilla con un extremo

3' libre. (Kuzminov 1999; Yeeles and Dillingham 2010). Alternativamente, *E. coli* tiene otra vía de inicio de recombinación, en la que actúa el complejo enzimático RecFOR, cuando la vía RecBCD está inactiva (Ivancic-Bace *et al.* 2003). En la ruta RecFOR intervienen las proteínas RecF, RecJ, RecO, RecQ, RecR y SSB. Las proteínas RecQ (helicasa) y RecJ (exonucleasa) procesan los DSBs, generando ADNcs con un extremo 3' libre al que se une la proteína SSB. La actividad conjunta de RecF, RecO y RecR desplaza a SSB, lo que permite que se cargue RecA (Morimatsu and Kowalczykowski 2003; Handa *et al.* 2009).

En eucariotas, el procesamiento de extremos es llevado en dos etapas. En la primera etapa, el complejo MRN(X) (Mre11, Rad50 y Nbs1 en mamíferos o Xrs2 en levaduras) junto con CtIP (en mamíferos) o Sae2 (en levaduras) se encarga de la resección basal de los extremos. En la segunda etapa hay dos vías, que son redundantes, pero en ambas se requiere una actividad nucleasa, una helicasa y proteínas asociadas (exo1-Sgs1-RPA o Dna2-Sgs1-Top3-Rmi1-RPA. Éstas generan ADNcs de más de 700 nt (Cejka *et al.* 2010; Niu *et al.* 2010).

1.1.2. Sinapsis: búsqueda de homología e intercambio de cadenas

La recombinasa RecA reconoce el ADNcs y forma un filamento helicoidal de nucleoproteína a partir del extremo 3' generado. Este filamento se ensambla y desensambla de una forma unidireccional (en dirección 5'→3'), de manera que los protómeros se añaden en un extremo y se desensamblan en el otro (Lusetti and Cox 2002). El ensamblado del filamento de RecA requiere la unión de ATP pero no la hidrólisis. El desensamblado de los filamentos requiere la hidrólisis de ATP (Lusetti and Cox 2002). En presencia de dATP se aumenta la actividad de hidrólisis y también aumenta el intercambio de cadenas (Menetski and Kowalczykowski 1989). RecA promueve la invasión de esta cadena hacia el ADNcd homólogo (Kowalczykowski *et al.* 1994; Kuzminov 1999). El resultado es la formación de un bucle-D, que es el apareamiento de la cola de ADNcs con su complementario en el homólogo intacto. El extremo 3' entrante es extendido por la ADN polimerasa y mediante ligación con los extremos de ADN libres, se forma una molécula de ADN con dos entrecruzamientos denominada intermediario de Holliday, descrito por primera vez en los años 60 (Holliday 1967).

RecA es la proteína central del proceso y existen diversas proteínas que modulan la actividad de RecA (revisado por Cox, 2007), además del complejo RecFOR y la proteína SSB. Estos moduladores pueden actuar activando o inhibiendo la actividad de RecA y en *E. coli* se han descrito: RecX (bloquea la extensión del nucleofilamento de RecA), DinI (estabiliza el filamento), la helicasa UvrD (desensambla los filamentos de RecA), RdgC (inhibe el intercambio de cadenas por competición en la unión al ADN, o la recientemente caracterizada PsiB (inhibe la unión de RecA al ADNcs y la formación del filamento)(Petrova *et al.* 2009).

1.1.3. Post-sinapsis: migración y resolución de las estructuras de Holliday

A continuación se produce la migración de la región heteroduplex generada por RecA a partir del punto de entrecruzamiento de las cadenas y su resolución. El conjunto de proteínas necesarias para la migración de ramas y la resolución de los intermedios de recombinación se conoce como resolvasoma. Las proteínas RuvA y RuvB son las encargadas de la migración (Iwasaki *et al.* 1992; Shinagawa and Iwasaki 1995) y la proteína RuvC lleva a cabo la resolución de los intermediarios de Holliday (Iwasaki *et al.* 1991; Sharples and Lloyd 1991), mediante la realización de dos cortes simétricos. Los productos de la reacción tienen extremos 5'-P y 3'-OH que son sellados por la ligasa. RuvC es la resolvasa de bacterias Gram negativas y Gram positivas con alto contenido en G+C. El análogo de RuvC en bacterias Gram positivas con bajo contenido en G+C (Filo Firmicutes y por tanto en *B. subtilis* es la proteína RecU (Sánchez *et al.* 2005).

El locus *ruv* de *E. coli* se identificó inicialmente por mutaciones que aumentaban la sensibilidad a agentes como la Mitomicina C (MMC), luz ultravioleta (UV) o radiación ionizante y además causaban un defecto en la división celular (Lloyd *et al.* 1984). Por otro lado, aunque las mutaciones *ruv* no causaban un defecto en recombinación por conjugación, cepas con mutaciones *ruv recBC sbcA* o *ruv recBC sbcBC* mostraban una significativa reducción en recombinación y los dobles mutantes *ruv uvrB* y *ruv uvrC* mostraban una sensibilidad mayor que cada uno de los mutantes sencillos. Estos resultados sugerían un papel en reparación del ADN por recombinación. Se vio que la expresión del locus se inducía por agentes genotóxicos y estaba regulada por el sistema SOS (Shurvinton and Lloyd 1982). La secuenciación del locus en *E. coli* reveló que estaba formado por dos genes, *ruvA* y *ruvB*, que formaban un operón (Benson *et al.* 1988). El tercer gen, *ruvC*, cuya mutación también aumenta la sensibilidad a agentes que dañan el ADN, se localiza en un operón aguas arriba del operón *ruvAB*. Por el contrario su expresión no se regula por el sistema SOS (Sharples *et al.* 1990; Takahagi *et al.* 1991).

Alternativamente en *E. coli* la post-sinapsis la puede llevar a cabo la proteína RecG, que cataliza la migración de ramas (Lloyd and Sharples 1993) y probablemente colabora con la resolvasa RusA para producir la resolución de las estructuras de Holliday (Bolt and Lloyd 2002). Por otra parte RecG está implicada en la reanudación de la replicación por un proceso dependiente de recombinación tras una parada de la horquilla de replicación (Gregg *et al.* 2002; McGlynn and Lloyd 2002; Rudolph *et al.* 2010).

En genomas circulares, este proceso da lugar dependiendo del sitio de corte, a dos cromosomas monoméricos o uno dimérico (Cromie and Leach 2000; Carrasco *et al.* 2004). En condiciones normales se producen mayoritariamente cromosomas monoméricos.

1.2. Restablecimiento de horquillas de replicación paradas mediante recombinación homóloga

En bacterias, es frecuente la parada de la replicación debido a daños en la cadena molde. Se ha visto que la reparación mediante RH es necesaria para la viabilidad de ciertos mutantes de replicación (Seigneur *et al.* 2000; Michel *et al.* 2001; Baharoglu *et al.* 2006). De ahí la importancia del proceso de RH como mecanismo para asegurar el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se han propuesto diversos mecanismos que pueden reanudar el avance de una horquilla de replicación parada (Cox 2001; Michel *et al.* 2004). Uno de ellos propone que lo primero que ocurre es una regresión de la horquilla de replicación, proceso que se ha descrito tanto en bacterias como en eucariotas. Puede ser llevado a cabo por RecG o RecA, además de por otras proteínas, como por ejemplo RuvAB (Atkinson and McGlynn 2009). Existen diversas rutas, dependiendo de dónde se sitúa el daño (cadena líder o cadena retrasada), para restablecer la horquilla de replicación. Por último, se cargaría de nuevo la maquinaria de replicación.

1.2.1. Regresión de la horquilla de replicación

El hecho de que el proceso de RH sea esencial en determinados mutantes de replicación, como es el caso de mutantes *rep* (helicasa replicativa accesoria), ciertos mutantes en subunidades de la DNA polIII y mutantes en *priA* (iniciador de restablecimiento de replicación), supone la generación de sustratos de recombinación una vez que la replicación se para. Una de las vías para generar el sustrato de recombinación es mediante la regresión de la horquilla de replicación. Durante la regresión las cadenas de nueva síntesis se aparean de forma que la horquilla retrocede y se genera una estructura de cuatro ramas, que se ha denominado “pata de pollo” (Michel *et al.* 2001).

En bacterias la regresión de horquilla puede producirse mediante varias vías (Seigneur *et al.* 1998; Cox 2001; Atkinson and McGlynn 2009). Una de las vías es mediante la acción de helicasas o translocasas. RecG es capaz de desanillar gran variedad de estructuras ramificadas, incluyendo HJs, horquillas de replicación y bucles-D. *In vitro* RecG es capaz de promover regresión de una horquilla (McGlynn and Lloyd 2000); (McGlynn and Lloyd 2001b). En *B. subtilis* se ha visto que RecG co-localiza con la horquilla de replicación (Lecointe *et al.* 2007), y los mutantes en *recG* son muy sensibles a una exposición a daño en el ADN (Sánchez *et al.* 2007), lo que confirmaría su papel en restablecimiento de horquillas de replicación paradas.

RuvAB también puede llevar a cabo la regresión de la horquilla de replicación en determinadas circunstancias. *In vitro*, RuvAB puede translocar una horquilla de replicación en dirección consistente con la regresión cuando el cargado de RuvB se restringe sólo al dúplex de ADN parental (McGlynn and Lloyd 2001a) y se ha visto que en *E. coli* la regresión mediada por RuvAB es esencial en determinados mutantes de replicación, que incluyen algunos mutantes en DNA polimerasa pol III (*holD*) y mutantes en *rep* (Baharoglu *et al.* 2006).

Otra vía de regresión de la horquilla de replicación se produce mediante RecA. Se ha visto que esta vía se activa en *E. coli* en mutantes *dnaB* (mutantes en la de la helicasa replicativa DnaB). RecA polimerizaría sobre la región de cadena sencilla generada y llevaría a cabo el reanillamiento de las cadenas molde, permitiendo el anillado a su vez de las cadenas de nueva síntesis, y por tanto la regresión de la horquilla (Seigneur *et al.* 2000).

1.2.2. Vías de restablecimiento de la replicación

Una vez formada la HJ o “pata de gallo”, puede ser procesada de dos formas. La primera implica corte de la estructura y la segunda se produce sin corte de la estructura. En el restablecimiento de la replicación mediante corte (Fig. 2), la HJ formada tras la regresión es procesada por RuvABC, generándose dos moléculas de ADN independientes, una de ellas con un extremo libre, facilitando la posterior eliminación del daño. El extremo de doble cadena libre, es procesado (por la acción de helicasas-exonucleasa, como RecBCD o helicasa en asociación con una exonucleasa de ADNcs, como RecQ-RecJ) y mediante la acción de RecA y de proteínas accesorias, recombina con el duplex de ADN homólogo, formando un bucle-D. El complejo RuvAB se une a la estructura, lleva a cabo la migración de ramas y finalmente RuvC resuelve la estructura, de forma que se puede cargar de nuevo la maquinaria de replicación (McGlynn and Lloyd 2002; Atkinson and McGlynn 2009).

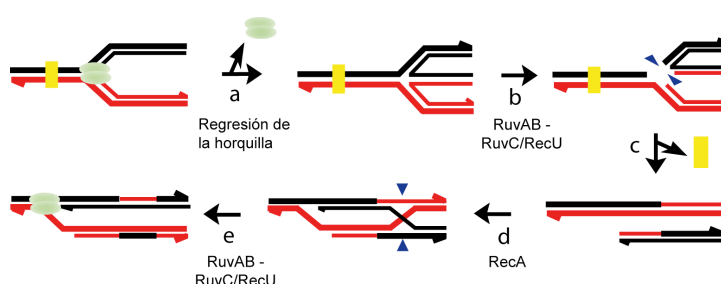


Figura 2. Restablecimiento de una horquilla de replicación mediante corte de la estructura de Holliday. (a) Desensamblado del replisoma y formación de la estructura de Holliday mediante regresión de la horquilla. (b) RuvAB-RuvC/RecU procesan la HJ, dando lugar a dos moléculas de dsDNA individuales y permitiendo la reparación del daño (c). (d) El extremo libre en el dsDNA, mediante la acción de RecA puede recombinar con el duplex homólogo para formar un bucle-D. (e) RuvAB – RuvC / RecU corta la HJ formada a partir del bucle-D. El replisoma se puede volver a cargar sobre la horquilla. El cuadrado amarillo representa el bloqueo en la horquilla producido por un daño. Los círculos verdes representan la maquinaria de replicación.

En el restablecimiento de la replicación sin corte, el duplex formado tras la regresión de la horquilla puede ser degradado mediante la acción de helicasas y exonucleasas, como RecBCD o RecQ-RecJ de *E. coli* o Exo1-Sgs1 de eucariotas (Cotta-Ramusino *et al.* 2005), de forma que se genera de nuevo una horquilla de replicación. El daño puede ser reparado mediante mecanismos específicos y la

maquinaria de replicación puede ser cargada de nuevo. RecG también puede llevar a cabo la reacción inversa, es decir, revertir la regresión, para formar de nuevo la horquilla de replicación, proceso que se da cuando hay un error en la cadena líder (McGlynn and Lloyd 2001b).

2. Recombinación homóloga en *Bacillus subtilis*

Durante el estado que se conoce como competencia natural, *B. subtilis* es capaz de procesar e internalizar ADN exógeno (Lorenz and Wackernagel 1994). En el desarrollo de la competencia se altera la expresión de ciertos genes, se sintetizan productos específicos, se detiene la replicación y se induce la expresión de RecA. En la transformación se produce la entrada de ADNcd por la degradación de una de las cadenas, ya que *B. subtilis* incorpora ADN de cadena sencilla. (Fernández *et al.* 2000). Cuando el ADN donador presenta homología con el receptor (transformación cromosomal) no se requiere replicación del ADN para su establecimiento. RecA cataliza la invasión en la región homóloga formando un bucle-D o estructura de tres cadenas, que es resuelta por endonucleasas específicas. En cambio, cuando el donador no presenta suficiente grado de homología con el receptor (transformación plasmídica), se necesita una homología interna (por ejemplo un oligómero) y replicación para que se establezca el plásmido (Kidane *et al.* 2009). Ambos procesos de transformación requieren recombinación, que puede ser dependiente (transformación cromosomal) o independiente de RecA (transformación plasmídica), de forma que se puede utilizar la eficiencia en la transformación como medida de recombinación. Mediante este tipo de análisis, así como la medida de la sensibilidad a distintos agentes que causan daños en el ADN, los genes involucrados en la recombinación genética en *B. subtilis* se han clasificado en diez grupos epistáticos: α (*recF*, *recO* y *recR*), β (*addA* y *addB*), γ (*recH* y *recP*), δ (*recN*), ε (*ruvA*, *ruvB* y *recU*), ζ (*recJ*, *recQ* y *recS*), η (*recG*), θ (*recX*), τ (*sbcC* y *sbcD*) y κ (*sbcE* y *sbcF*) (tabla 1 (Sánchez *et al.* 2007; Ayora *et al.* 2011). RecA no está incluida en ningún grupo puesto que es la proteína clave en el proceso. Células con una mutación nula en *recA* ($\Delta recA$), son muy sensibles a agentes que dañan el ADN. Del mismo modo, mutaciones en los genes incluidos en los grupos α , δ , ε y η afectan a la viabilidad de la cepas cuando se exponen a un agente mutagénico. En cambio, mutaciones en los genes incluidos en los grupos β , γ y ζ reducen la viabilidad levemente (Fernández *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2006).

α	β	γ	δ	ε	ζ	η	θ	τ	κ
<i>recF</i>	<i>addA</i>	<i>recH</i>	<i>recN</i>	<i>ruvA</i>	<i>recS</i>	<i>recG</i>	<i>recX</i>	<i>sbcC</i>	<i>sbcE</i>
<i>recO</i>	<i>addB</i>	<i>recP</i>		<i>ruvB</i>	<i>recQ</i>			<i>sbcD</i>	<i>sbcF</i>
<i>recR</i>				<i>recU</i>	<i>recJ</i>				

Tabla 1. Genes implicados en recombinación y grupos epistáticos en *B. subtilis*.

Introducción

Los genes *recA*, *recF*, *recO*, *recR*, *recN*, *ruvA*, *ruvB*, *recQ* y *recG* tienen su homólogo con igual nombre en *E. coli*, mientras que los homólogos en función de los genes de *B. subtilis* *addAB* y *recU* son *recBCD* y *ruvC* respectivamente en *E. coli*. En cambio, el gen *recS* no parecen tener homólogo en *E. coli* y se desconocen por el momento los genes asociados a las mutaciones *recH* y *recP*. Como se ha visto en *E. coli*, el proceso de RH se puede dividir en varias fases: reconocimiento del daño y procesamiento de los extremos, cargado de RecA e intercambio de cadenas entre la molécula de ADN dañada y la molécula idéntica no dañada y finalmente migración del punto de entrecruzamiento y resolución de los intermediarios de Holliday. Mediante la fusión de proteínas de fluorescencia (GFP, CFP, YFP, etc.) a las distintas proteínas que intervienen en recombinación y su localización *in vivo* en las células, se ha podido establecer un orden temporal de actuación en el proceso tras una inducción de daño (Fig. 3; (Kidane *et al.* 2004; Kidane and Graumann 2005a; Sánchez *et al.* 2005; Sánchez *et al.* 2006).

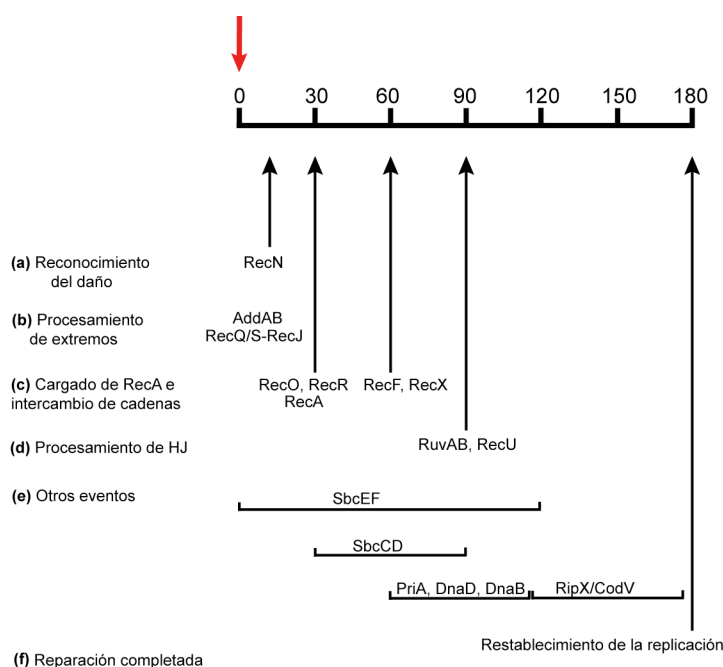


Figura 3. Orden temporal de ensamblaje de proteínas durante la reparación de DSBs en *B. subtilis*. La flecha roja indica el momento de inducción del daño. **(a)** RecN reconoce el DSB y unida al ADN se agrupa formando un único foco por nucleóide (CR) a los 15 min de la inducción de daño. **(b)** El procesamiento de los extremos por el complejo AddAB o por una helicasa tipo RecQ (RecQ/RecS) junto con la exonucleasa RecJ en los CRs tiene lugar entre los 15-30 min después de la inducción de daño. Tras el procesamiento, SsbA se une al ADNcs protegiéndolo. **(c)** A los 30 min RecA y sus moduladores RecO y RecR son reclutadas a los CRs, y a los 60 min son reclutados los moduladores RecF y RecX. Tiene lugar el intercambio de cadenas y generación de la HJ. **(d)** RuvAB y RecU son reclutados a los CRs a los 90 min y tiene lugar la resolución de la HJ. **(e)** Al mismo tiempo que las etapas (c) y (d) pueden darse otros procesos (por ejemplo, reparación dependiente de SbcD y ensamblaje del replisoma). **(f)** Los cromosomas diméricos acumulados son procesados por las proteínas RipX/CodV. A los 180 min de la inducción de daño finaliza el proceso de reparación y se restablece el crecimiento celular.

Tras 15 min de inducir un daño en el ADN mediante adición de ácido nalidíxico o MMC o mediante la acción de la endonucleasa específica de sitio (endonucleasa HO de levaduras) en células de *B. subtilis* en fase de replicación activa, se observa la relocalización de la proteína RecN, que desde una localización difusa, se agrupa formando un foco de proteína RecN por nucleóide. Esta relocalización, que es independiente de la dosis, tiene lugar en los denominados centros de reparación (CR) en más del 75% de las células (Kidane *et al.* 2004). RecN es un miembro de la familia de proteínas SMC ("*structural maintenance of chromosomes*"). Se ha visto que RecN interacciona con extremos 3' OH del ADNcs en presencia de ATP y Mg^{2+} y es capaz de agruparlos dando lugar a estructuras similares a una roseta (Sánchez *et al.* 2008). De esta forma acercaría regiones de ADN dañadas donde serían reclutadas posteriormente las proteínas implicadas en la reparación.

El extremo 3' de ADNcs requerido para el inicio de la recombinación (pre-sinapsis) lo genera el complejo AddAB, enzima compuesta por una unidad helicasa y dos unidades de nucleasa (Yeeles and Dillingham 2010). En *B. subtilis* y en el resto de Firmicutes existe una vía alternativa de procesamiento de los extremos, en la que intervienen una helicasa tipo RecQ (RecQ o RecS) junto con la exonucleasa RecJ (RecQ-RecJ o RecS-RecJ). Un mutante doble *addAB ΔrecJ* tiene un efecto sinérgico y la viabilidad de las células se reduce hasta niveles similares a los de un mutante *ΔrecA* (Sánchez *et al.* 2006). En *B. subtilis* el procesamiento de extremos se puede llevar a cabo por tanto, por dos vías complementarias: AddAB y/o por RecQ(S)-RecJ, donde RecQ y RecS tendrían actividades solapantes. Se mostró que en ausencia de AddAB y RecJ, RecN forma de dos a cuatro focos por nucleóide, en vez de un único foco, así como no se observa el ensamblado de RecA en los CR (Kidane and Graumann 2005a; Sánchez *et al.* 2006). Este resultado sugiere que RecN actúa antes que las proteínas de procesamiento de extremos, como detector de DSBs y también en una fase posterior, ya que AddAB y RecJ son necesarias para la localización de RecN en los CRs. Además es necesaria para la localización de RecA en los filamentos ("*threads*"), ya que se ha visto que RecN facilita la formación del bucle D llevada a cabo por RecA (Sánchez *et al.* 2008). RecA es reclutada junto con RecO y RecR a los CRs a los 30 min de la inducción de daño. RecO, que interacciona con SsbA, carga a RecA en el ADNcs cubierto por SsbA (SSB en *E. coli*) (Manfredi *et al.* 2008; Manfredi *et al.* 2010). RecF es reclutada al complejo RecN-RecO-RecA a los 60-90 min de la inducción de daño. Se forman focos de RecN, RecO y RecA en ausencia de RecF, pero RecF no forma focos en ausencia de RecO (Kidane *et al.* 2004; Kidane and Graumann 2005a). Además de RecN, en *B. subtilis* existen otras proteínas de tipo SMC, que intervienen en reparación del ADN vía RH, como son SbcC y SbcE (Mascarenhas *et al.* 2006; Krishnamurthy *et al.* 2010).

El proceso de ensamblado y desensamblado de RecA sobre el ADNcs está regulado por dATP y ATP y por proteínas accesorias como SsbA (Carrasco *et al.* 2008; Manfredi *et al.* 2008). Se conocen además otros moduladores de la actividad de RecA (Cox 2007) como RecX, que inhibe la extensión del filamento de RecA. Se ha visto que RecF antagoniza la función de RecX, estimulando la formación de filamentos de RecA (Lusetti *et al.* 2006). La helicasa PcrA (UvrD en *E. coli*) funcionaría como una antirecombinasa ya que promueve la disociación del

filamento de RecA (Anand *et al.* 2007), al igual que la proteína MutS2 de bacterias, que inhibe el intercambio de cadenas y suprime la RH mediante la resolución de los intermediarios tempranos de recombinación (Fukui *et al.* 2008). La resolvasa RecU, presente en Firmicutes, es capaz de modular la actividad de RecA, estimulando la formación del bucle D e inhibiendo un extensivo intercambio de cadenas (Carrasco *et al.* 2005). Se desconoce cómo es la interacción entre RecU y RecA y el papel *in vivo* de esta capacidad moduladora de RecA, por lo que será objeto de estudio de este trabajo. RecA unida al ADNcs promueve la invasión de éste en el ADN homólogo intacto, lo que provoca el desplazamiento de una de las dos cadenas y la formación del bucle D. Usando como molde la cadena de ADN intacta, se recupera la información genética perdida y mediante ligación de los extremos se genera la HJ.

La migración del punto de entrecruzamiento da lugar a la extensión de la región de heteroduplex, proceso que llevan a cabo las translocasas RuvAB (Sánchez *et al.* 2005) o RecG (Sánchez *et al.* 2007) proteínas que se encuentran en todas las clases de bacterias (McGlynn and Lloyd 2002; Wen *et al.* 2005). La proteína RecU es la responsable de la resolución de los intermediarios en *B. subtilis* (Ayora *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2005). Se detecta un foco único de RecU en el nucleóide a los 100 - 120 min de la inducción de daño, que colocaliza con los focos de RecN en los CRs. El reclutamiento de RecU a los CRs es dependiente de RuvAB, de forma que en un mutante *ruvAB* no se detectan focos de RecU (Sánchez *et al.* 2005), lo que sugiere que las tres proteínas, además de participar en la misma vía, podrían actuar formando un complejo. Al contrario que en *E. coli*, donde RuvAB y RecG parecen tener un papel redundante, a pérdida de las dos translocasas, RuvAB y RecG afecta letalmente al crecimiento de las células, incluso en ausencia de daño, al acumularse intermediarios tóxicos (Carrasco *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2007). Una cepa mutante en *recG* es muy sensible a agentes que dañan el ADN y es letal en combinación con una mutación en *recU* (Sánchez *et al.* 2005; Sánchez *et al.* 2007). Estos resultados sugieren la existencia de rutas complementarias en la resolución de los intermediarios de recombinación y por tanto en la segregación cromosomal. En ausencia de las translocasas (RuvAB o RecG) y/o de la resolvasa (RuvC/ RecU), las HJs pueden ser disociadas mediante una vía que está pobremente definida. Se propone que la topoisomerasa TopoIII junto con una helicasa tipo RecQ disuelven la doble HJ, proceso que también se ha descrito en eucariotas (Wu *et al.* 1999; López *et al.* 2005).

En genomas circulares en condiciones silvestres (WT, “wild type”) la resolución de las estructuras da lugar mayoritariamente a cromosomas monoméricos (sólo el 0,05% de las células son anucleadas). Los cromosomas diméricos acumulados son resueltos mediante la acción de la recombinasa específica de sitio RipX/CodV (XerCD en *E. coli*) (Sherratt 2003). Mutaciones en los genes *ruvA*, *ruvB*, *recU* o *recG* dan lugar a un aumento de 80 a 150 veces de células anucleadas y cromosomas no separados, en ausencia de cualquier agente tóxico del ADN (Carrasco *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2007), lo que indicaría que en ausencia de estas proteínas las HJs se resuelven hacia cromosomas diméricos o no se resuelven. Esto sugiere un papel en segregación esencial de las proteínas que intervienen en las fases tardías de la recombinación homóloga en *B. subtilis*. Mutaciones en los genes *sms* (*radA* en *E. coli*) o *subA*, cuyos productos tienen un importante papel en

reparación por RH, suprimen parcialmente el defecto en reparación y segregación de los mutantes *ruvAB*, *recG* y *recU* (Carrasco *et al.* 2002; Carrasco *et al.* 2004).

2.1. Cargado del replisoma en la horquilla de replicación

La reactivación de la horquilla de replicación parada es independiente del sitio de inicio de la replicación *oriC*. En *E. coli* y en *B. subtilis* interviene la helicasa hexamérica PriA (Polard *et al.* 2002). *B. subtilis* presenta dos cargadores de la helicasa, DnaB y DnaD (Velten *et al.* 2003) como en el caso de eucariotas y además dos replicasas, PolC y DnaE. La primasa DnaG proporciona el extremo 3'OH para la síntesis de ADN (Dervyn *et al.* 2001; Sanders *et al.* 2010). En el caso de *E. coli*, se han descrito tres vías de cargado del replisoma tras una parada en la reparación, la vía PriA-PriB-DnaT, PriC-PriA o PriC-Rep dependiendo del tipo de estructura que se genera debido a la presencia de un daño en la horquilla de replicación (cadena líder o retrasada) (Heller and Mariani, 2005; Gabbai and Mariani, 2010). Aunque las estructuras generadas son distintas, el posterior cargado del replisoma es idéntico en las tres vías. *E. coli* presenta un único cargador de la helicasa, DnaC, que permite el cargado de la helicasa replicativa DnaB. Una vez cargada DnaB, recluta a la primasa DnaG.

2.2. Papel de proteínas de recombinación homóloga en competencia natural en *B. subtilis*

Como se ha comentado anteriormente, durante el proceso de transformación natural que presentan algunas bacterias como *B. subtilis*, se produce la captación de ADN exógeno. En *B. subtilis*, la maquinaria de incorporación del ADN se localiza en los polos de la célula (Hahn *et al.* 2005) junto con las proteínas SsbB y DprA (Berka *et al.* 2002). Tanto el proceso de transformación plasmídica como el cromosomal son procesos dependientes de recombinación (Kidane *et al.* 2009). Se ha visto que RecA y RecU colocaliza con la maquinaria de incorporación de ADN en un único polo y que RecN oscila de polo a polo (Kidane and Graumann 2005b). Una vez incorporado el ADNcs, se para la oscilación de RecN al unirse al ADNcs, RecA forma unas estructuras filamentosas que salen del polo hacia el centro de la célula y RecU se desensambla del polo para adoptar una posición difusa (Kidane and Graumann 2005b; Kidane *et al.* 2009). En el caso de la transformación cromosomal, RecA polimerizaría sobre el ADNcs para mediar la búsqueda de homología y la invasión de cadenas. En cambio, en la transformación plasmídica, puede no existir homología, por lo que es un proceso independiente de RecA, pero se ha visto que es dependiente de RecO y RecU (Kidane *et al.* 2009). La acumulación de RecU en los polos es dependiente de RecA y una vez agregado ADN de cualquier clase, RecU se disipa. En cambio, RecO se encuentra dispersa por todo el citosol, y una vez agregado el ADN se acumula en los polos. Esta acumulación está influenciada por RecN pero no por RecA, y se debería a la capacidad de RecO de llevar a cabo

anillamiento de ADNcs complementarios aun si se encuentran cubiertos por SsbA o SsbB (Kidane *et al.* 2009; Manfredi *et al.* 2010). Se desconoce cual es la función de RecU en transformación plasmídica, pero podría tener un importante papel como modulador de la actividad de formación de focos (nucleación de RecA en el ADN y/o filamentación de RecA) durante el proceso de transformación, por lo que será objeto de estudio en este trabajo.

3. Resolución de los intermediarios de Holliday

Los genes que codifican las proteínas RuvA y RuvB están ampliamente distribuidos en bacterias, encontrándose frecuentemente en el mismo operón, como es el caso de *B. subtilis*, mientras que la proteína RuvC es menos común (Sharples *et al.* 1999). En general, las proteínas RuvA y RuvB están altamente conservadas en bacterias, aunque la conservación en secuencia entre los ortólogos de RuvA es bastante menor que entre los ortólogos de RuvB (Hishida *et al.* 1996; Sharples *et al.* 1999). RuvC está ausente en el genoma del filo Firmicutes que incluye entre otros *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* y *Borrelia burgdorferi*. Estos organismos presentan la resolvasa RecU, que fue caracterizada primero en *B. subtilis* (Ayora *et al.* 2004), y posteriormente en *B. stearothermophilus* (Kelly *et al.* 2007) y en *M. genitalum* (Sluijter *et al.* 2010).

En *B. subtilis*, al igual que en *E. coli*, el operón *ruvAB* forma parte del sistema SOS, pero a diferencia de *E. coli*, también se induce en células competentes en ausencia de daño (Yasbin *et al.* 1992). En células *rec⁺* la expresión del operón se induce 2,2 veces tras una exposición a luz ultravioleta o MMC (Au *et al.* 2005). Puesto que la actividad de las proteínas RuvA y RuvB de *B. subtilis* no han sido caracterizadas, serán estudiadas en este trabajo.

3.1. El complejo translocasa: las proteínas RuvA y RuvB

3.1.1. RuvA

En *B. subtilis* el gen que codifica para RuvA da lugar a una proteína de 201 aa y 22,5 kDa de peso molecular. El alineamiento de secuencias muestra que RuvA de *B. subtilis* (*BsuRuvA*) presenta una identidad de secuencia de 33% con RuvA de *Thermus thermophilus* (*TthRuvA*) y de 34% con RuvA de *E. coli* (*EcoRuvA*) (Fig. 4). Se ha obtenido la estructura de rayos X de *TthRuvA* y *EcoRuvA* (Hargreaves *et al.* 1998; Ariyoshi *et al.* 2000; Yamada *et al.* 2002) y aunque muestran una identidad de secuencia del 37%, la estructura secundaria y terciaria se ha conservado. Estudios *in vivo* mostraron que *TthRuvA* es capaz de complementar, aunque no totalmente, el defecto en reparación de un mutante *ruvA* en *E. coli* (Ohnishi *et al.* 2000).

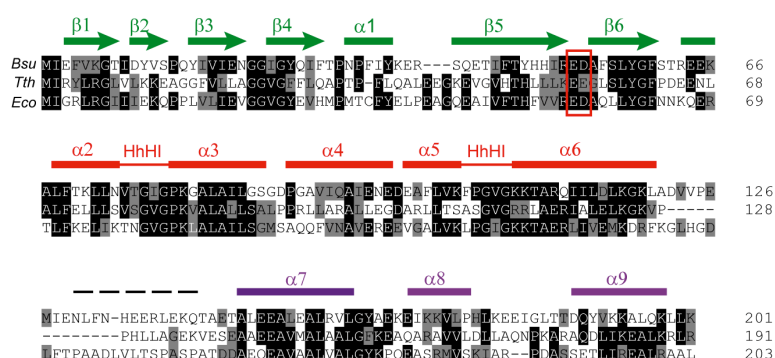


Figura 4. Alineamiento de secuencias de las proteínas *BsuRuvA*, *TthRuvA* y *EcoRuvA*. Los residuos idénticos en al menos dos de las secuencias se muestran en negro y los conservados en al menos dos de las secuencias en gris. Se muestra sobre las secuencias: en color verde el dominio I, en color rojo el dominio II, con los motivos HhHI y HhHII; y en color morado el dominio III. El cuadro rojo señala los residuos ácidos E55 y D56, situados entre las hojas β5 y β6. La línea discontinua indica el lazo flexible entre el dominio II y III.

RuvA de *E. coli* une específicamente *in vitro* pequeñas HJ de forma dependiente de estructura e independiente de secuencia. Mediante ensayos de retardo en gel se vio que RuvA forma dos tipos de complejo con la HJ (Parsons *et al.* 1992; Whitby *et al.* 1996). Un complejo de mayor movilidad, que correspondería con un tetrámero de RuvA unido a la HJ y un complejo de menor movilidad, que corresponde a dos tetrámeros de RuvA unidos a la HJ. Se ha obtenido la estructura de rayos X de los dos tipos de complejos (Figura 5; (Rafferty *et al.* 1996; Roe *et al.* 1998; Ariyoshi *et al.* 2000), lo que ha proporcionado información acerca de la estructura de la proteína y el modo de unión a la HJ.

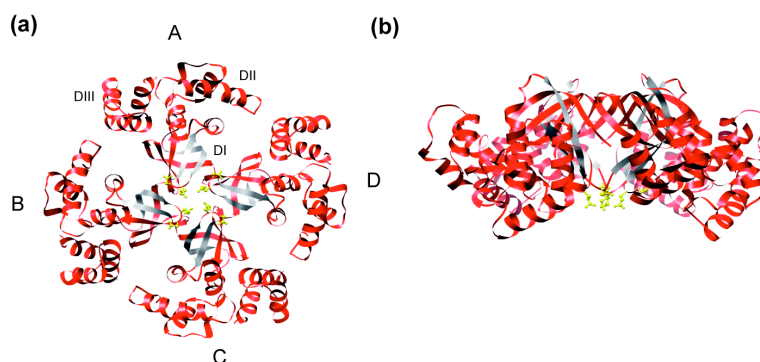


Figura 5. Estructura de RuvA de *E. coli*. Vista frontal (a) y vista lateral (b) de un tetrámero de RuvA (PDB: 1CUK). A, B, C, D indican cada uno de los cuatro monómeros. DI, DII y DIII indican los tres dominios que contiene cada monómero. En gris se muestran las hojas β5 y β6 del dominio I. En amarillo se muestran los residuos E55 y D56, implicados en la interacción de RuvA con el ADN.

Cada monómero de RuvA está compuesto por tres dominios: I, II y III. (Rafferty *et al.* 1998). El dominio I, que comprende la región N terminal, está principalmente implicado en la tetramerización. El dominio II presenta dos copias del motivo HhH (Helix-hairpin-helix). Estos motivos en proteínas de unión a ADN como ADN polimerasas, ADN ligasas, proteínas S13 ribosomales... (Doherty *et al.* 1996). El dominio III comprende la región de interacción con RuvB (Nishino *et al.* 1998; Nishino *et al.* 2000). El dominio II y III se encuentran unidos por un lazo flexible de 13 residuos de longitud.

El tetrámero de RuvA presenta una estructura de simetría 4, con una cara cóncava y otra convexa. La cara convexa del tetrámero presenta una superficie de carga mayoritariamente negativa. La cara cóncava está implicada en la unión al ADN, ya que cada lóbulo del tetrámero, cargado en su superficie positivamente, interaccionaría con un brazo de la HJ (Fig. 6). La región de interacción comprende una serie de residuos ácidos muy conservados en otras proteínas RuvA, como es el caso del residuo glutámico 55 y aspártico 56, que en *BsuRuvA* corresponden a los residuos glutámico 53 y aspártico 54 respectivamente, localizados entre las hojas $\beta 5$ y $\beta 6$, también muy conservadas en todas las proteínas RuvA (Fig. 4; (Ingleston *et al.* 2000). Estos residuos están directamente implicados en la determinación de especificidad de unión de RuvA a la HJ. De esta forma, cada tetrámero de RuvA se une al centro de la estructura, cubriendo unos 13 nt a cada lado del punto de entrecruzamiento (Hiom and West 1995). El dominio de octamerización comprende la α hélice 6 de ambos tetrámeros, que se disponen en orientación casi antiparalela (Roe *et al.* 1998; Fujiwara *et al.* 2008). Una vez que la proteína se une en el centro de la HJ, hace que ésta adopte una conformación extendida. En ese momento induciría la unión de RuvB para formar el complejo RuvAB-HJ.

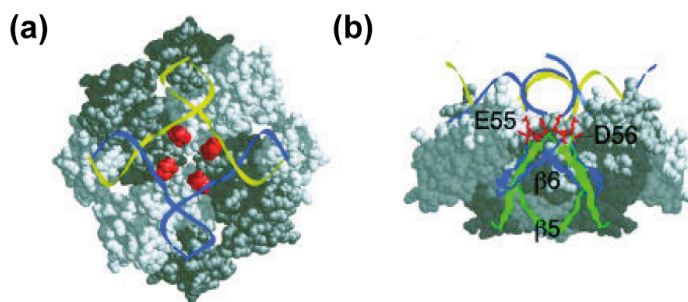


Figura 6. Estructura de RuvA en complejo con la estructura de Holliday. Vista frontal **(a)** y lateral **(b)** donde dos de los brazos de la HJ se muestran en amarillo y los otros dos en azul. En RuvA la superficie de interacción con el ADN formada por los residuos E55 y D56 de los cuatro tetrámeros se muestran en rojo (Ingleston *et al.*, 2000).

3.1.2. RuvB

La proteína RuvB es un miembro de la clase AAA⁺ (ATPasas asociadas con actividades celulares). Los ortólogos de RuvB están altamente conservados entre bacterias especialmente los dominios responsables de la actividad helicasa. También se han encontrado homólogos en eucariotas, desde levaduras hasta humanos (Matias *et al.* 2006; Radovic *et al.* 2007).

Las actividades bioquímicas asociadas a RuvB se han descrito para la proteína de *E. coli*. Se ha obtenido la estructura cristalina de RuvB de *Thermogota maritima* (*TmaRuvB*) y de *Thermus thermophilus* (*TthRuvB*), (Putnam *et al.* 2001; Yamada *et al.* 2001). *TmaRuvB* y *TthRuvB* presentan un 57 y 59% de identidad de secuencia con *BsuRuvB* respectivamente, lo que sugiere que *BsuRuvB* debería tener la misma estructura. Cada monómero de RuvB consta de tres dominios principalmente (Figura 7). El dominio amino terminal (N), central (M) y carboxi terminal (C). Los dominios N (formado por 5 hojas β y 4 α hélices que las rodean) y M (formado por 5 α hélices) se asemejan al que presentan otras proteínas AAA⁺ y son esenciales para la actividad ATPasa. El dominio N incluye el dominio de unión a nucleótido formado por los motivos Walker A y Walker B. Contiene un motivo β hairpin ($\beta 4$ y $\beta 5$) que comprende la región de interacción con RuvA (Nishino *et al.* 1998; Nishino *et al.* 2000; Han *et al.* 2001; Yamada *et al.* 2002). El dominio C es el responsable de la interacción con el ADN, donde el residuo R318 en *EcoRuvB* (equivalente a R316 en *BsuRuvB* y R302 en *TthRuvB*) parece estar directamente implicado (Iwasaki *et al.* 2000; Ohnishi *et al.* 2005). Este residuo se localiza en un motivo bisagra – hélice que está presente en proteínas que unen ADN (Putnam *et al.* 2001; Yamada *et al.* 2001).

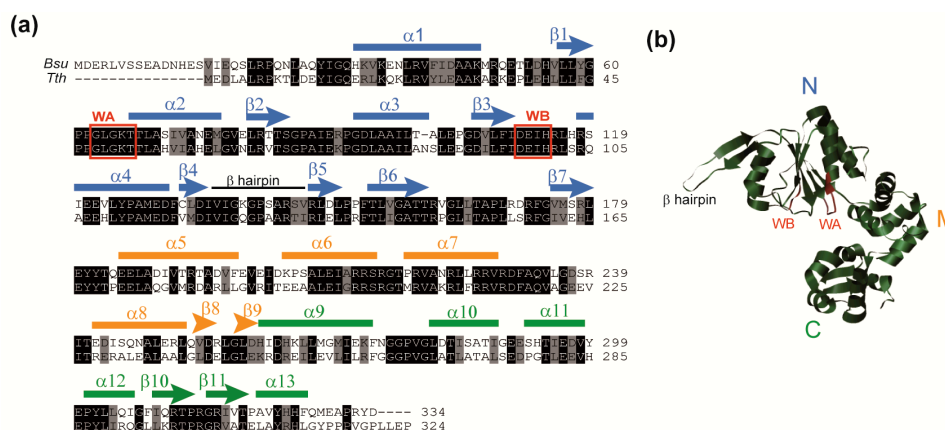


Figura 7. Estructura de RuvB. (a) Alineamiento de secuencias entre *BsuRuvB* y *TthRuvB*. Los elementos de estructura secundaria se muestran sobre la secuencia (b) Estructura cristalina del monómero de *TthRuvB* (PDB: 1HQC), donde los tres dominios vienen indicados por N, dominio amino terminal; M, dominio central; C, dominio carboxi terminal. En rojo se muestran los motivos Walker A (WA) y Walker B (WB). En el dominio N se muestra el motivo β hairpin, región de interacción con RuvA (Han *et al.* 2001).

Ensayos de entrecruzamiento covalentes (“cross-linking”) y de cromatografía de filtración llevados a cabo en ausencia de metales han mostrado la presencia de monómeros y dímeros, pero cuando RuvB se encuentra unida al ADN en presencia de un análogo no hidrolizable del ATP como es el ATP γ S y de altas concentraciones de Mg²⁺, forma estructuras dodecaméricas, que corresponderían con dos anillos de RuvB, estructura similar a la de otras helicasas hexaméricas como DnaB (Yu *et al.* 1996). La actividad ATPasa de RuvB proporciona la energía para la rotación del ADN y por tanto la migración del punto de entrecruzamiento. Durante la migración, el ADN pasa a través de RuvA y sale por la cavidad en cada anillo de RuvB (Hiom *et al.* 1996), el cual pasaría por la cavidad central sin sufrir ninguna alteración (Stasiak *et al.* 1994). RuvB muestra una baja afinidad de unión a ADN, aunque la afinidad por ADNcs es mucho menor que por ADNcd (Muller *et al.* 1993a) y por sí sola presenta una débil actividad ATPasa, que es estimulada en presencia de ADNcd y RuvA (Mitchell and West 1994; Hishida *et al.* 1999).

3.1.3. Actividad de complejo RuvAB

RuvB por sí sola es capaz de promover migración de ramas en intermediarios de recombinación generados por RecA, en condiciones de altas concentraciones de proteína y de ≥ 15 mM Mg²⁺, que favorecen su unión al ADN (Tsaneva *et al.* 1992; Muller *et al.* 1993b) aunque dado que los mutantes *ruvA* y *ruvB* tienen el mismo fenotipo en reparación de ADN, no parece que la actividad de RuvB sola sea fisiológicamente relevante. A bajas concentraciones de Mg²⁺, se necesita la presencia de RuvA para mediar la interacción de RuvB con el ADN, y más específicamente con las estructuras de Holliday reduciendo además la estequiometría de RuvB (Parsons and West 1993). En presencia de Mg²⁺ y de ATP, el complejo RuvAB tiene actividad helicasa sobre HJs *in vitro* (Iwasaki *et al.* 1992; Tsaneva *et al.* 1993) y también se ha demostrado actividad helicasa sobre ADNcd circular superenrollado o relajado (Adams and West 1995).

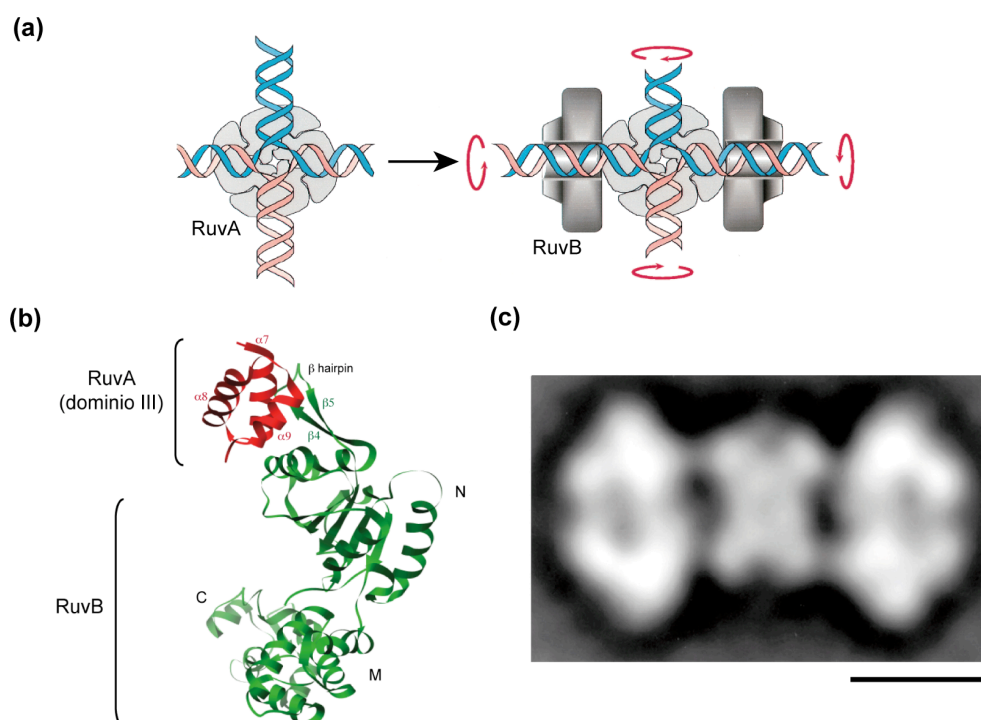


Figura 8. Complejo RuvAB **(a)** Representación del complejo de RuvAB sobre la HJ. Los dos hexámeros de RuvB se posicionan a ambos lados de RuvA, unida en el punto de entrecruzamiento. Las flechas rojas indican la dirección de rotación (adaptado de Whitby et al., 1996). **(b)** Estructura cristalina del complejo RuvA(dom III)-RuvB (PDB: 1IXS). En rojo se muestran las tres α hélices del dominio III de RuvA. En verde se muestra el monómero de RuvB, donde se indican el dominio N, M y C y el motivo β hairpin, situado entre las hojas $\beta 4$ y $\beta 5$. **(c)** Imagen de microscopía electrónica del complejo RuvAB-HJ. La barra representa 100 Å (Yamada et al. 2002).

Se ha demostrado la interacción entre RuvA y RuvB y la formación de un complejo *in vitro* con la HJ mediante diversas técnicas, que incluyen ensayos de retardo en gel (West et al. 1993), de filtración en gel (Hishida et al. 1999; Han et al. 2001; Ohnishi et al. 2005), de entrecruzamiento de proteínas (Eggleston et al. 1997; Davies and West 1998) y microscopía electrónica (Fig. 8c; (Yu et al. 1997); (Mayanagi et al. 2008)). La región de interacción comprende el motivo β hairpin de la región N terminal de RuvB ($\beta 4$ y $\beta 5$) y el dominio III de RuvA (hélices $\alpha 7$ y $\alpha 9$) (Fig. 8b; (Nishino et al. 2000; Han et al. 2001; Yamada et al. 2001)). Mutantes de RuvB en el motivo β hairpin están afectados en la interacción tanto funcional como física con RuvA (Han et al. 2001). En el complejo RuvAB-HJ, el tetrámero (u octámero) de RuvA se uniría en el centro de la HJ, y los anillos hexaméricos de RuvB se unirían rodeando a los brazos de la estructura, a ambos lados de RuvA, interaccionando ambas proteínas directamente (Figura 8a y c).

El complejo RuvAB desempeñaría dos funciones principalmente, una de resolución de HJs en la etapa final de la RH (Fig. 1; (Iwasaki et al. 1992)) y otra función en reversión de la horquilla de replicación (Fig 2; (McGlynn and Lloyd

2001a). Se ha visto que mutaciones puntuales en *ruvA* y *ruvB* que dan lugar a un complejo afectado en la actividad de migración de ramas *in vitro*, son capaces de promover RH *in vivo*. Por el contrario si afectan a la capacidad de promover regresión de la horquilla de replicación, por lo que ambas funciones pueden separarse genéticamente (Baharoglu *et al.* 2008; Le Masson *et al.* 2008). En mutantes en el dominio de octamerización de RuvA sólo se detecta la formación del complejo I (un tetrámero de RuvA unido a la HJ) y la actividad ATPasa y de migración de ramas de RuvB se ve altamente reducida, lo que se debe por tanto a la ausencia del complejo octamérico II (Fujiwara *et al.* 2008). Estudios recientes han mostrado que aunque la formación del complejo II se requiere para promover migración de ramas *in vitro*, mutantes puntuales de octamerización de RuvA son activos *in vivo* en RH, pero inactivos en promover regresión de la horquilla. Por tanto la octamerización de RuvA tendría un papel esencial en el restablecimiento de horquillas de replicación paradas (Bradley *et al.* 2011).

3.2. Las resolvasas de estructuras de Holliday

Las resolvasas de HJ se caracterizan porque reconocen estructuras de ADN de cuatro ramas e introducen dos cortes simétricos en el punto de entrecruzamiento de cadenas. Estas enzimas contienen una alta proporción de residuos cargados positivamente, lo que concuerda con la capacidad de unirse al ADN y forman dímeros, lo que hace posible que produzcan cortes simultáneos en las dos cadenas opuestas. El sitio activo habitualmente consiste en la disposición de tres o cuatro residuos ácidos que coordinan la unión al metal. Los cationes divalentes son esenciales para la resolución de las estructuras pero no para la unión a ellas. En la mayoría de los casos catalizan la resolución en presencia de Mg^{2+} .

Estas enzimas han sido clasificadas en dos grandes grupos: las que pertenecen a la superfamilia de las proteínas con estructura similar a las nucleasas y las que pertenecen a la superfamilia de las proteínas con estructura similar a las integrasas (Lilley and White 2000; Sharples 2001). La enzima RusA de *E.coli* y la endonucleasa VII del bacteriófago T4 no han sido clasificadas en ninguno de los dos grupos. En el primer grupo, al que pertenecen las endonucleasas de restricción (tipo I y II), están incluídas las resolvasas Hjc y Hje de arqueas, la endonucleasa I del bacteriófago T7 y la resolvasa RecU de bacterias del Filo Firmicutes, como es *B. subtilis* (McGregor *et al.* 2005). En el segundo grupo, al que pertenece la integrasa HIV, están incluídas la enzima RuvC de *E. coli*, Ydc2 de *Schizosaccharomyces pombe*, CCE1 de *Saccharomyces cerevisiae* y A22R de *poxvirus* (Fig. 9).

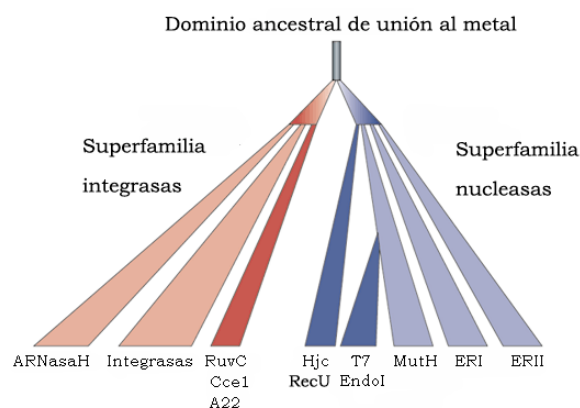


Figura 9. Árbol de las resolvasas (adaptado de Lilley and White, 2000). Estas enzimas se clasifican en dos grandes familias. La superfamilia de las integrasas incluye a las enzimas dependientes de secuencia, RuvC y Cce1. Por otra parte la Hjc de arquea y la endonucleasa I del fago T7 son miembros de la superfamilia de las nucleasas, en la que estaría incluida RecU. Otros miembros que se incluyen en la superfamilia son las enzimas de restricción tipo I y II y proteínas de reparación como MutH. Todas tienen en común en que presentan un sitio de unión a metales que es necesario para la catálisis, pero que se organiza de forma diferente para acomodar a la gran variedad de sustratos específicos de cada enzima. Por lo tanto, ambas familias podrían estar relacionadas a través de un dominio ancestral de unión a metales.

La resolvasa RuvC de *E. coli* fue la primera resolvasa caracterizada bioquímicamente (Iwasaki *et al.* 1991) y está presente en bacterias Gram positivas con alto contenido en G+C y en Gram negativas. Hay una gran conservación de los cuatro residuos ácidos (D7, E66, D138, D142). Se sabe que constituyen el sitio catalítico de unión al metal, y que son necesarios para la actividad endonucleasa (Saito *et al.* 1995). Tres de estos residuos están conservados en otros miembros de la familia de las integrasas, lo que implica un mecanismo catalítico similar. En el dímero de RuvC, cada monómero consiste en 5 hojas β flanqueadas por α hélices. Esta disposición es similar a la que presentan RNasa H y la integrasa de HIV (Ariyoshi *et al.* 1994). RuvC exhibe una marcada preferencia por las HJs, y no es capaz de reconocer y cortar otras estructuras ramificadas de ADN. Al unirse a la HJ, modifica su estructura, llevándola hacia una conformación extendida o plana, que no es total, por lo que el complejo tiene una simetría 2 (Bennett and West 1995). Presenta especificidad por una secuencia de nucleótidos determinada, 5'-(A/T)TT(G/C)-3', en la que corta preferentemente entre la tercera y cuarta posición (Eggleston and West 2000). Dos residuos básicos, K107 y K118 están implicados en el contacto con la HJ para su resolución (Yoshikawa *et al.* 2000).

Hjc es una endonucleasa presente en arqueas. Fue identificada en *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus sulfataricus* (Komori *et al.* 1999). Su secuencia está muy conservada en todas las arqueas, con la excepción de *Thermoplasma acidophilum*.

Todas las resolvasas de arqueas muestran propiedades similares. No muestran una aparente especificidad de secuencia para la resolución, pero es muy específica de estructuras de cuatro ramas, a las cuales distorsiona en una estructura en forma de X (White *et al.* 1997). Mediante estudios de mutagénesis dirigida se han identificado residuos ácidos (E9, D33, E46) y básicos (R10, R25, K48, K81) esenciales para la actividad catalítica de *P. furiosus*. Se han obtenido similares resultados para la resolvasa de *S. solfataricus*. La proteína Hje es otra resolvasa de arqueas que se identificó también en *S. solfataricus* y tiene propiedades similares a Hjc, incluyendo la preferencia por estructuras de cuatro ramas (Kvaratskhelia and White 2000b; Kvaratskhelia and White 2000a).

3.2.1. La resolvasa RecU de *Bacillus subtilis*

RecU (inicialmente llamada RecG) ha sido también llamada PrfA (*penicillin-binding protein related-factor A*). Se pensaba que pertenecía a la clase A de la familia de las PBP (*penicillin-binding protein*), ya que se localiza en el operón que contiene el gen *ponA*. Éste codifica para la proteína PBP1, que participa en el crecimiento de la bacteria y formación del septo durante la división celular (Popham and Setlow 1995).

El gen *recU* tal y como lo define Fernández y colaboradores (Fernández *et al.* 1998) posee un segundo codón de iniciación en el codón 33. En las bases de datos un gran número de autores consideran al segundo ATG como posible primer residuo de la proteína, a la que se denominó RPU (*“recombination protein U”*). RPU no presentan la región amino terminal ni la tétrada conservada NRGM (Fig. 10a; A3F2U7) y se desconoce si existe en alguna bacteria del filo. Los ortólogos de RecU están muy conservados dentro del Filo Firmicutes, que cuenta con 157 representantes, los cuales se pueden dividir en dos grupos (Fig. 10). Un primer grupo incluye proteínas RecU similares a la de *B. subtilis* de 195 a 213 residuos, que presentan una larga y flexible región amino terminal que incluye cuatro residuos muy conservados, NRGM (residuos 30 al 33 en RecU de *B. subtilis*) (Fig. 10c). El segundo grupo incluye proteínas RecU de 166 a 177 residuos, con una región amino terminal corta (Fig. 11b). Además en las bases de datos también se encuentra anotada la proteína RPU (*recombination protein U*), que se caracterizan porque no presentan la región amino terminal ni la tétrada conservada (Fig. 10a; A3F2U7) y se desconoce si existe en alguna bacteria del filo.

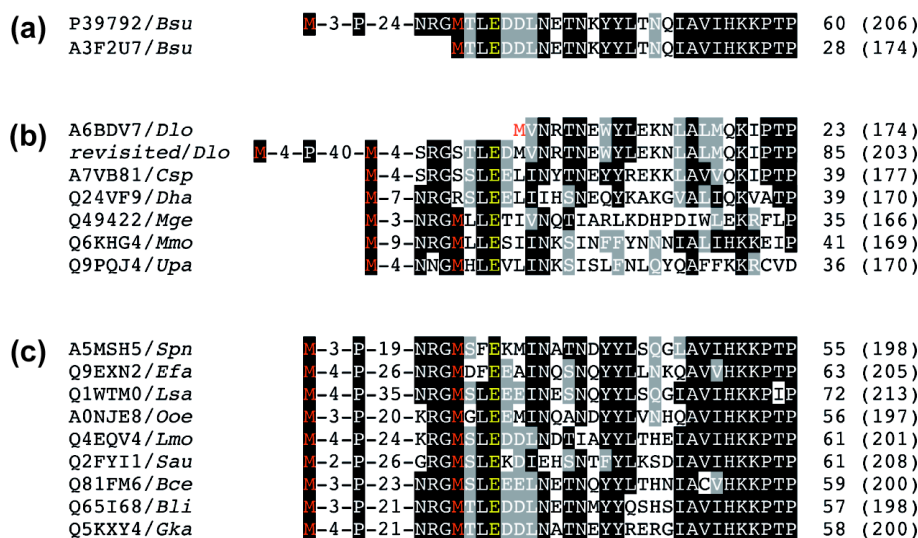


Figura 10. Alineamiento de secuencias de la región N terminal de la familia RecU. (a) Se muestran las secuencias de las dos variantes de RecU anotadas, RecU (P39792) y RPU (A3F2U7). (b) Secuencias de proteínas RecU de aproximadamente 170 residuos. (c) Secuencias de proteínas RecU de aproximadamente 200 residuos. En rojo se muestran las metioninas conservadas y en amarillo se muestra el residuo catalítico E36. La longitud total de la proteína se muestra entre paréntesis. En negro se muestran los residuos idénticos y en gris los conservados.

Muchos de los genes *recU* tienen dos posibles sitios de inicio de la traducción, por lo que podrían codificarse dos tipos de polipéptido. En el caso de *B. subtilis* los posibles codones de inicio de la traducción corresponden con el codón 1 y el 33 (Fig. 10a). Darían lugar entonces a dos formas de RecU, que están anotadas en la base de datos, la forma larga como RecU (P39792) y la forma corta como RPU (A3F2U7).

3.2.1.1. Estructura

RecU forma un dímero en solución. Cada monómero está formado por 206 aminoácidos y tienen un peso molecular de 23959 Da (Fig. 12; (McGregor *et al.* 2005)). Presenta en el centro cinco hojas β (β 1, β 2, β 3, β 5 y β 6), flanqueadas por dos hélices α (α 1 y α 5) por un lado y por otras tres (α 2, α 3 y α 4) por el otro lado que forman el cuerpo principal de la proteína o núcleo. Presenta además una hélice 3_{10} formada por los residuos 113 - 116. Además del núcleo, hay un lazo formado por los residuos 56-89, el final del cual no se ha podido cristalizar (residuos 66-79 en el monómero A y residuos 63-76 en el monómero B). En cambio, la región del tallo sí está presente en una de las estructura cristalina de RecU de *Bacillus stearothermophilus* (*BstRecU*) (Kelly *et al.* 2007). Igualmente, en RecU de *B. subtilis* (*BsuRecU*) los 33 primeros residuos del extremo N-terminal de ambos monómeros no se han podido cristalizar, lo que podía sugerir que RPU podría ser la resolvasa o

Introducción

que esos residuos no formaban una estructura regida. Se analizaron cristales de RecU por resonancia magnética y se ha podido demostrar que los primeros 32 residuos estaban en el polipéptido, pero su estructura era flexible (McGregor *et al.* 2005).

Los lazos de los dos monómeros se unen a través de interacciones hidrofóbicas, constituyendo un tallo, que sale del cuerpo principal (McGregor *et al.* 2005). El cuerpo principal presenta una serie de residuos ácidos muy conservados (E36, D88, D99, E101) que están implicados en la unión de cationes divalentes, al igual que se ha observado en otras resolvasas y endonucleasas. Además, presenta dos residuos de lisina (K56, K103) también conservados, que parece que tienen un posible papel en la catálisis, debido a su analogía con otras endonucleasas.

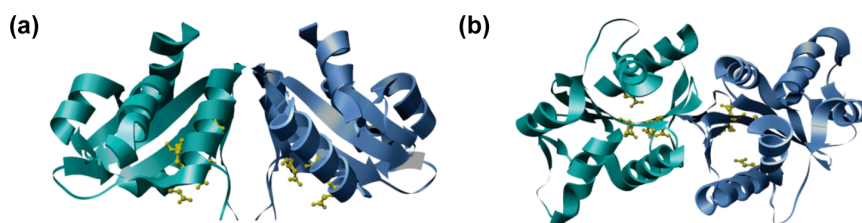


Figura 11. Estructura cristalina del dímero de RecU. (a) Vista longitudinal de los dos monómeros, uno representado de color verde y el otro de azul. (b) Vista transversal. El sitio activo de cada monómero, formado por los residuos E36, D88, D99 y E101, se muestra de color amarillo (McGregor *et al.* 2005).

Gracias a sus dos centros activos, RecU puede introducir cortes simétricos en el esqueleto fosfodiéster del ADN sustrato. Los residuos ácidos E36, D88, D99 y E101 son esenciales para la actividad catalítica de la proteína (McGregor *et al.* 2005). La arquitectura común con enzimas de restricción tipo II indica residuos básicos adicionales, que en RecU correspondería a K103, que podrían estar implicados en la actividad de la proteína. La unión de cationes divalentes, Mg^{2+} o Mn^{2+} , es esencial para la actividad catalítica de la proteína. La actividad de RecU se da por activación de una molécula de agua que unida al metal divalente cataliza el ataque nucleofílico en el esqueleto de fosfato del ADN.

La estructura general del dímero de RecU es muy similar al de la resolvasa Hjc de la arquea *Pyrococcus furiosus* (PfHjc). La mayoría de los elementos que forman la estructura secundaria de RecU y en particular las cinco laminas β de la parte central son superponibles en cada una de las subunidades con la resolvasa PfHjc (Fig. 11). Los residuos catalíticos de RecU (E36, D88, E101 y K103) se superponen muy bien con los identificados en PfHjc. En cambio la región del tallo presente en RecU no se encuentra en PfHjc. Se ha propuesto un modelo de unión de RecU a las HJs (McGregor *et al.* 2005). En este modelo la región del tallo tiene un papel clave en el reconocimiento y unión al ADN, ya que el tallo se introduciría por el

agujero que presenta la conformación plana de la HJ, interaccionando la región final con el esqueleto de fosfato, para llevar a cabo el corte de las cadenas (Fig. 12).

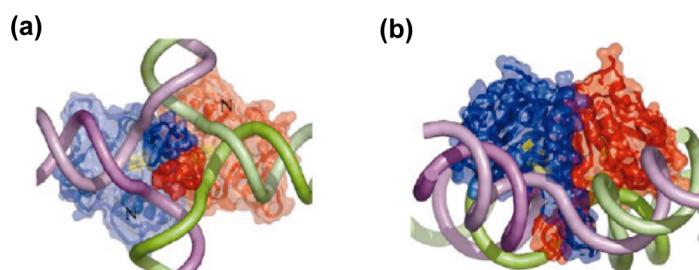


Figura 12. Modelo de unión de RecU a la estructura de Holliday **(a)** Vista desde abajo de los dos ejes de RecU que coincide con los cuatro ejes de la estructura de Holliday. Cada monómero de RecU se muestra de un color, uno rojo y otro azul. El centro activo se muestra de color amarillo. El ADN queda representado como tubos que corresponden al esqueleto de fosfato. **(b)** Vista frontal de los dos ejes de RecU mostrando cómo la región del tallo penetraría a través del centro de la estructura (McGregor *et al.* 2005).

3.2.1.2. Función

RecU tiene una importante actividad biológica. Mediante análisis genéticos de transformación cromosomal y plasmídica se demostró que se requiere la actividad de RecU para que haya una eficiente recombinación homóloga y reparación del ADN. Además se requiere para una correcta segregación de los cromosomas en *B. subtilis*, en la cual su ausencia produce de 1-3% de células anucleadas y con nucleoides asimétricamente localizados (Carrasco *et al.* 2004).

En cuanto a su actividad bioquímica, RecU es capaz de unirse a bajas concentraciones de Mg^{2+} a ADNcs y ADNcd con una afinidad media, y a las estructuras de tres y cuatro ramas (HJs) con una alta afinidad (Ayora *et al.* 2004). A altas concentraciones de Mg^{2+} es capaz de introducir cortes simétricos en las HJs y también cortes desacoplados. A diferencia de las resolvasas Hjc y Hje, que no muestran especificidad por una secuencia de corte, se determinó que la proteína presenta preferencia por la secuencia 5'- $G/T\ G\downarrow CA/C$ -3', situando el sitio de corte entre G y C.

Se demostró que *in vivo*, RecU regula positivamente y negativamente algunas funciones de RecA (Carrasco *et al.* 2005), aunque se desconoce cómo se produce esa modulación y si existe una interacción directa entre las proteínas. En la etapa de pre-sinapsis RecU ayuda a RecA a llevar a cabo la invasión de cadenas. En una fase posterior, RecU es capaz de inhibir la hidrólisis de dATP por parte de RecA, por lo que inhibe el avance del intercambio de cadenas de RecA. Redirige entonces la migración de ramas hacia el complejo RuvAB. Posteriormente RecU resolvería la estructura de Holliday por cortes simétricos. No se ha descrito en otras bacterias,

pero en arqueas y mamíferos hay evidencias de un papel de la resolvasa en etapas tempranas de la RH. Al igual que podría pasar con RecU, en algunos ortólogos de Rad51 se ha descrito un papel en pre y post-sinapsis. Es el caso por ejemplo del complejo Rad51C-XRCC3 (CX3), que en etapas tempranas de la recombinación se une al ADN, cataliza el apareamiento de ADN y recluta a Rad51 (Kurumizaka *et al.* 2001; Forget *et al.* 2004). Por otro lado, el complejo CX3 juega un importante papel en la resolución de las HJs, por lo tanto está asociado también a las etapas tardías de la recombinación homóloga (Liu *et al.* 2007). En la arquea *Pyrococcus furiosus*, RadB (parálogo de RadA) interacciona *in vitro* con RadA y con la resolvasa Hjc, regulando el corte de HJs por parte de Hjc (Komori *et al.* 2000).

3.3. Conexión entre el proceso de migración de ramas y resolución

En la última etapa de la recombinación homóloga el complejo RuvAB lleva a cabo la migración del punto de entrecruzamiento de la HJ y finalmente la resolvasa RuvC/RecU resuelve la estructura mediante cortes simétricos. Estudios genéticos sugieren que ambas reacciones están acopladas *in vivo* y la eficiente acción de la resolvasa requiere la actividad de migración de ramas. En *E. coli* los mutantes *ruvA*, *ruvB* y *ruvC* presentan el mismo fenotipo (Sharples *et al.* 1990) y el defecto se complementa con la sobreexpresión de una resolvasa alternativa (Mandal *et al.* 1993; Mahdi *et al.* 1996). Ensayos de recombinación *in vitro* realizados usando RecA, RuvA, RuvB y RuvC de *E. coli*, han mostrado que la resolución de la HJ se inhibe con la adición de anticuerpos anti-RuvA, anti-RuvB o anti-RuvC, lo que aporta una evidencia de una acción coordinada entre RuvAB y RuvC (Eggleston *et al.* 1997) y por tanto de un complejo RuvABC activo o “resolvasoma”. Mediante experimentos de inmunoprecipitación se ha demostrado la formación del complejo de las tres proteínas sobre HJs (Davies and West 1998). Además existe una interacción directa entre RuvB y RuvC (Eggleston *et al.* 1997) y se ha visto que RuvAB estimula la eficiencia de corte de RuvC (van Gool *et al.* 1998; Zerbib *et al.* 1998; van Gool *et al.* 1999). Por otro lado, también se ha detectado la formación de un complejo RuvA-RuvC *in vitro*, aunque se desconoce cual es papel que tiene en la formación y función del complejo RuvABC y se ha visto que RuvC puede estimular la reacción de migración de ramas de RuvB, aunque de forma poco eficiente (van Gool *et al.* 1998).

Se han propuesto dos modelos de actuación de RuvA, RuvB y RuvC durante el proceso de migración y resolución de las HJs (Fig. 13). En el primer modelo primero se produciría la migración de ramas, llevada a cabo por RuvAB y en un segundo paso, al llegar a la secuencia de corte que reconoce RuvC, se disociaría RuvA y se cargaría RuvC, que resolvería la estructura (Fig. 13a). El segundo modelo implica la formación de un complejo RuvABC sobre la HJ, en el que un tetrámero de RuvA se uniría en el centro de la estructura por una de las caras. En la otra cara se uniría un dímero de RuvC y RuvB se uniría a los lados de RuvA/C interaccionando con ambas (Fig. 13b). El hecho de que se haya detectado un complejo entre RuvA y RuvC (Whitby *et al.*, 1996) y que en ensayos *in vitro* en las que se favorece migración se detecte también resolución (van Gool *et al.* 1999) apoyan el segundo modelo, al menos en *E. coli*.

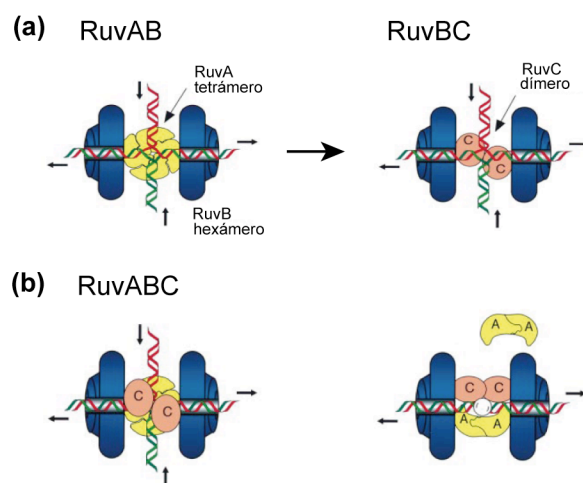


Figura 13. Modelo de interacciones de RuvA, RuvB y RuvC sobre la estructura de Holliday. (a) El tetrámero u octámero de RuvA se une al centro de la estructura y facilita el cargado de dos hexámeros de RuvB. Tiene lugar la migración del punto de entrecruzamiento hasta la secuencia de corte de RuvC. En ese momento se disociaría RuvA, queda formado el complejo RuBC y RuvC resuelve la estructura. (b) Se forma un complejo RuvABC, lo que supone la disociación de un tetrámero de RuvA. RuvC se une a la cara opuesta. El complejo lleva a cabo la migración hasta la secuencia de corte de RuvC. (adaptado de van Gool et al., 1998).

Las evidencias genéticas y bioquímicas apoyan la teoría de la formación de un complejo RuvABC o resolvasoma en *E. coli*. Aunque hay una alta conservación de las proteínas RuvA y RuvB en procariotas, no hay tanta conservación de las proteínas de resolución de HJs o resolvasas. Análisis genéticos han demostrado que los mutantes *ruvAB* no son compatibles con *recG* ni con *recU* (Sánchez *et al.* 2005), sugiriendo que las translocasas (RuvAB y RecG) tienen algunas funciones únicas y que la translocasa RuvAB y el resolvasoma (RuvB y RecU) son esenciales. Esto puede resultar en distintos mecanismos de procesamiento de las Hjs. En *B. subtilis*, modelo de estudio de bacterias Gram +, se desconoce el mecanismo molecular de la etapa final de RH. Se caracterizó a la proteína RecU como la resolvasa de HJs, pero el complejo translocasa RuvAB no ha sido caracterizado. Mediante estudios genéticos se demostró que se requiere la presencia de RuvAB para que RecU sea reclutada a los centros de reparación (van Gool *et al.* 1999) (Sánchez *et al.* 2005) por lo que además de estar actuar en el mismo proceso, podrían existir interacciones directas entre las proteínas.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral son los siguientes:

- Determinar la función de la región amino terminal en la actividad de la resolvasa RecU, mediante el análisis *in vivo* y caracterización bioquímica de mutantes en dicha región.
- Analizar la actividad moduladora de RecU sobre RecA y determinar el papel de RecU durante el proceso de transformación plasmídica.
- Comprobar el modelo propuesto de unión de RecU a las estructuras de Holliday y analizar el papel de la región del tallo en el reconocimiento de las estructuras de Holliday.
- Caracterizar bioquímicamente la actividad de las proteínas RuvA y RuvB de *B. subtilis* y analizar la actividad del complejo translocasa RuvAB.
- Determinar la posible existencia de un complejo resolvasoma en *B. subtilis*. Analizar las interacciones físicas y funcionales entre el complejo translocasa RuvAB y la resolvasa RecU.

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1. Cepas

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	UTILIZACIÓN
XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ΔM15 Tn10 (Tet)] (Stratagene)	Células para construcción y mantenimiento de plásmidos.
BL21(DE3)	pLysS B F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal (DE3) (Stratagene)	Células para sobreexpresión de proteínas
RM40	recF lacI ^q lacZΔM15 <i>P_{lac}-xerC</i>	Células para generación de HJ <i>in vivo</i>

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*.

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	UTILIZACIÓN
BG214	<i>amyE</i> , <i>att^{SPB}</i> , <i>aat^{ICEBs}</i> , <i>metB5</i> , <i>sigB37</i> , <i>trpC2</i> , <i>xre-1</i>	Cepa de laboratorio
BG855	<i>recU::Sp (ΔrecU)</i>	(Fernández <i>et al.</i> , 1998)
BG190	<i>ΔrecA</i>	(Ceglowski <i>et al.</i> , 1990)
BG539	<i>ΔrecU</i> , <i>ΔrecA</i>	Este trabajo
BG703	<i>ΔruvAB</i>	(Sánchez <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 3. Cepas de *Bacillus subtilis*.

1. 2. Reactivos y materiales

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Columna de cromatografía Micro Bio-Spin, Hidroxiapatita	Bio-Rad
IPTG, rifampicina	Calbiochem
LiteAblot western blot kit	Euroclone
Metanol, Hidrolizado de caseína	Fluka
Membrana PVDF, Sefarosa G-50, Q- Sefarosa, SP- Sefarosa, GFX PCR DNA and gel band purification kit, Ni-NTA agarosa	GE Healthcare
SDS, Sulfato amónico, Urea	ICN
Anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón y anti-IgG de rata conjugados a peroxidasa	Jackson ImmunoResearch
Enzimas de restricción, fragmento klenow de ADN polimerasa I	MBI Fermentas
Acetato sódico trihidrato, Ac. bórico, Ac. Clorhídrico, Ac. Fórmico, Ac. Tricloracético,	Merck

Alcohol Isoamílico, Azul de Coomassie, Xilencianol, Azul de Bromofenol, Cloroformo, Cloruro magnésico hexahidratado, Cloruro de Calcio, Etanol Absoluto, Imidazol, Isopropanol, Fenol, Glicina, Hidróxido de Sodio, Isopropanol, L-metionina, D/L Triptófano, Dimetilsulfóxido (DMSO), PEG 6000, Titriplex (EDTA), Tritón-X 100	
Filtros de 0,05 µm (tipo VM), 0,45 µm (tipo HAWP), 0,22 µm (tipo Millex-GS)	Millipore
Glicerol	MP Biomedicals
Enzimas de restricción, Polinucleótido Kinasa (PNK), T4 ligasa	New England Biolabs
Acido Acético Glacial, Vaselina filante	Panreac
Disuccinimidil suberato (DSS)	Pierce
[$\alpha^{32}\text{P}$]- dATP, [$\gamma^{32}\text{P}$]- ATP	Perkin Elmer
Wizard plus Kit extracción de plásmido	Promega
Agarosa, Agar bacteriológico, extracto de levadura, Triptona	Pronadisa
Kit extracción de plásmido	Qiagen
FastStart Taq DNA polimerasa, Proteinasa K, Ribonucleasa A (RNasa A)	Roche
Acrilamida, Bisacrilamida	Serva
Ampicilina , Bromuro de Etidio, Cloranfenicol, Dithiothreitol, Glutaraldehído, Lisozima, Poli-Lisina, Metilmetano sulfonato, Ac. Diaminopimélico	Sigma
Membranas de diálisis	Spectrum
PfuTurbo ADN polimerasa	Stratagene
LB, Fosfatasa Alcalina (SAP), Tris	USB
Medio de montaje Vectashield	Vector

Tabla 4. Reactivos y materiales.

1.3. Tampones

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
A	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1mM MgCl ₂ , 50 µg/ml BSA
B	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1mM EDTA, 50 µg/ml BSA
C	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 10mM MgCl ₂ , 50 µg/ml BSA
D	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 10mM MgOAc ₂ , 50 µg/ml BSA
E	50 mM Tris-HCl pH 8, 1mM DTT, 5mM EDTA, 50 µg/ml BSA
F	50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10% Glicerol
G	50 mM KP pH 7,5 , 30 mM Imidazol, 5 mM β-mercaptoetanol, 10% Glicerol
H	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol
I	20 mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgOAc ₂ , 1 mM DTT, 50 µg/ml BSA
J	50 mM Tris-HCl pH 8, 15 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 50 mg/ml BSA

Tabla 5. Tampones de reacción.

2. Métodos

2.1 Manipulación de células

2.1.1 Obtención de células competentes

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se crece un cultivo en LB en presencia del antibiótico correspondiente a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{560} = 0,4$). Se centrifugan las células y se resuspenden en 50 mM CaCl₂. El tratamiento con CaCl₂ permeabiliza la membrana, de manera que el ADN puede introducirse de manera pasiva en las células. Las células competentes se conservan a -80° C con 15% de glicerol hasta su utilización (Hanahan 1983).

B. subtilis desarrolla competencia natural en condiciones determinadas de crecimiento y nutrientes. Las células competentes de *B. subtilis* se obtienen mediante inoculación de una colonia en medio líquido GM1. Se crece el cultivo 16 h a 30° C sin agitación. Al día siguiente se diluye el cultivo en medio GM1 fresco hasta una $DO_{560} = 0,05$. Se incuba el cultivo a 37° C con agitación. Tras 90 min desde que las células alcanzan la fase estacionaria, se añade 15% de glicerol y se guardan rápidamente a -80° C hasta su utilización (Bott and Wilson 1968).

Medio GM1: SBase 1x, 0,5% glucosa, 0,1% extracto de levadura, 0,02% hidrolizado de caseína, 0,8 mM MgSO₄, 0,025% D/L-triptófano y 0,02% L-metionina.

2.1.2 Transformación bacteriana

La transformación de células competentes de *E. coli* se lleva a cabo siguiendo el protocolo de choque térmico (Hanahan 1983). Se mezclan 200 µl de células con 10-100 ng de ADN plasmídico y se incuban a 4°C durante 30 min. Después se da un choque térmico a 42°C durante 1 min y se vuelven a dejar a 4°C durante 2 min. Por último las células se plaquean en LB agar con el correspondiente antibiótico.

Para la transformación de *B. subtilis*, se hace una dilución 1:10 de células competentes en medio GM2. El cultivo se incuba 1 h a 37°C con agitación. Después, se añaden a las células 100-200 ng de ADN y se incuban 30 min a 37°C. Por último las células se plaquean en LB agar con el correspondiente antibiótico (Bott and Wilson 1968).

Medio GM2: GM1 suplementado con 3,3 mM MgSO₄ y 0,5 mM CaCl₂.

2.2 Manipulación de ADN

2.2.1 Purificación y cuantificación de ADN

El ADN plasmídico se purifica mediante el protocolo de lisis alcalina (Birnboim and Doly 1979) o usando el kit de extracción de plásmido de Qiagen o Promega.

El ADNcs de pGEM-3Zf(+) se obtiene a partir de células de *E. coli* que contienen dicho plásmido, a las que se infecta con fago ayudante VCS. Las células se eliminan por centrifugación y los fagos, que contienen el ADNcs, se precipitan con PEG 6000 y NaCl 2,6M. El ADNcs se obtiene mediante extracción fenólica para eliminar las proteínas del fago y posterior precipitación con etanol.

El ADN cromosómico de *B. subtilis* se purifica siguiendo el procedimiento ya descrito (Sambrook *et al.*, 1989).

La concentración de ADN se cuantifica mediante medida de la absorción a 260nm y la pureza de la muestra viene determinada por la relación de absorbancia 260nm/280nm.

2.2.2 Plásmidos

La tabla 6 detalla los plásmidos usados y/o contruidos durante este trabajo

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN Y REFERENCIA
pHP13	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>
pT712	Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (GIBCO-BRL)
pET3b	Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (Novagen)
pET21b	Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (Novagen). Introduce colas de 6 histidinas en el carboxilo terminal de la secuencia de ADN clonada
pET15	Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (Novagen).

pDG148a	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> (Stragier <i>et al.</i> , 1988)
pGEM-3Zf(+)	Se utiliza para obtener ADNcs al inducir la resplicación desde el fago f1 en orientación (+) (Promega)
pSD115	Plásmido para generar HJs <i>in vivo</i> . (McCulloch <i>et al.</i> , 1994)
pCB564	pHP13 que contiene el gen <i>recU</i> de <i>B. subtilis</i>
pCB568	pT712 que contiene el gen <i>recU</i> para su sobreexpresión
pCB737	pDG148a que contiene el gen <i>ruvB</i> -His6x de <i>B. subtilis</i> para su sobreexpresión
pCB632	pET3b que contiene el gen <i>ruvA</i> de <i>B. subtilis</i> para su sobreexpresión
pCB696	pHP13 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> K56A
pCB698	pHP13 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> R71A
pCB687	pHP13 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> Y80A
pCB688	pHP13 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> F81A
pCB697	pT712 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> K56A
pCB699	pT712 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> R71A
pCB693	pT712 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> Y80A
pCB694	pT712 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> F81A
pCB896	pET15 que contiene el gen mutado de <i>recU</i> Δ 1-29

Tabla 6. Plásmidos

2.2.3 Marcaje radiactivo de ADN

El marcaje de ADNcs en el extremo 5' se lleva a cabo mediante tratamiento con T4 Polinucleótido Kinasa (PNK), usando como sustrato [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. Se incuba la reacción durante 30 min a 37°C y posteriormente se inactiva la enzima mediante incubación a 75°C durante 15 min. El exceso de nucleótido se elimina mediante el paso por una matriz Sefadex G50 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.4 Construcción de estructuras de Holliday sintéticas

Las estructuras de Holliday se construyen mediante anillamiento de oligonucleótidos complementarios en presencia de 100 mM de tampón fosfato pH 7,5. Se calienta la muestra a 95°C durante 10 min y se deja bajar lentamente la temperatura hasta 30°C.

Los oligonucleótidos que se usan para la construcción de HJ se detallan en la tabla 7.

NOMBRE	SECUENCIA 5'- 3'
JO 3.1	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGA AAGCTT CCGGTAGCAGCCTGA GCGGTGGTTGAATTCCTCGAGGTTCTGTCGCTTGCG
JO 3.2	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGAATTCAACCACCGCTCAACT CAACTGC AGTCT AGACTCGAGGTTCTGTCGCTTGCG
JO 3.3	CACAAGCGACAGGAACCTCGAGTCT AGACT GCAGTTGAGTCCT TGCTAGGACGGATCCCTCGAGGTTCTGTCGCTTGCG
JO 3.4	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGGATCCGTCTAGCAAGGGGC TGCTACCGGA AAGCTT CTCGAGGTTCTGTCGCTTGCG

Tabla 7. Oligonucleótidos para construcción de HJs cortas. En negrita se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción.

La generación de las seis especies de HJ utilizadas en el ensayo de distorsión se realiza mediante digestión de la HJ original con enzimas de restricción. Cada rama de la HJ presenta un sitio de corte para una enzima de restricción (BamHI: B, EcoRI: R, HindIII: H, XbaI: X) (Tabla 6). Cada especie se genera mediante digestión doble y el nombre viene dado por las dos ramas largas que quedan.

2.2.5. Construcción *in vivo* de estructuras de Holliday

Las HJs largas se obtienen de la cepa de *E. coli* RM40 que contiene el plásmido pSD115, siguiendo el protocolo descrito en McCulloch *et al.*, 1994. El plásmido pSD115 (4,95 kb) contiene dos repeticiones directas del sitio de recombinación *cer* que son diana de la recombinasas específicas de sitio XerC y XerD. Estas recombinasas promueven recombinación intramolecular *in vivo* e *in vitro*. La inducción de la síntesis de XerC, clonada en la cepa RM40 bajo el promotor *lac*, resulta en la conversión parcial del plásmido en dos productos de recombinación, de tamaños 2,6 y 2,35 kb. También se detecta la formación de intermediarios denominados “figura 8” que contienen una estructura de Holliday. Estas moléculas resultan de eventos de recombinación incompletos. La HJ contiene una zona de homología en el punto de entrecruzamiento de 300 pb, que por tanto puede migrar. La obtención de la HJ de 4 ramas se hace mediante digestión con la enzima HindII.

Se crece un cultivo de *E. coli* RM40/pSD115 en presencia de ácido diaminopimélico (50 µg/ml) a 37°C hasta una D.O de 0,4. En ese momento se induce la expresión de XerC mediante adición de 2mM de IPTG. Se incuba el cultivo durante 90 min a 37°C y el ADN plasmídico se extrae de las células mediante métodos convencionales. El ADN plasmídico se digiere con la enzima HindII y se purifica la HJ desde geles de agarosa.

2.2.6. Mutagénesis dirigida

Los mutantes puntuales en el gen de *recU* se obtienen mediante un sistema de doble amplificación por PCR:

- En la primera PCR se usa como ADN molde el plásmido pCB564 que lleva clonado el gen de *recU*. Se utilizan como cebadores un oligonucleótido que anilla en el plásmido aguas arriba del sitio de multiclonado y un oligonucleótido que contiene la mutación que se quiere introducir. Por otro lado, para amplificar la otra parte del gen se utilizan como cebadores un oligonucleótido que anilla aguas abajo del sitio de multiclonado y un oligonucleótido complementario al que contiene la mutación.

- En la segunda PCR se usan como molde los fragmentos de gen amplificados en la primera PCR y como cebadores los oligonucleótidos externos. De esta forma se obtiene el gen de *recU* con la mutación puntual deseada.

2.3. Obtención de proteínas

2.3.1. Sobreexpresión de proteínas

La proteína RecU y las variantes mutantes se sobreexpresaron a partir de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *plyS* que contiene el plásmido pT712 con el gen de *recU* clonado bajo el promotor ϕ 10 del fago T7. En el caso de la proteína RuvA, el gen está clonado en el plásmido pET3b, bajo el mismo promotor.

En ambos casos se inocula un cultivo con una colonia procedente de placa fresca y se incuba durante 16h a 37°C. Al día siguiente se diluye el cultivo en medio LB fresco hasta una $D.O_{560} = 0,05$ y se deja crecer a 37°C con agitación hasta una $D.O_{560} = 0,8$. En ese momento se añade IPTG a una concentración de 2mM y se incuba en las mismas condiciones durante 30 min más. Se añade Rifampicina a una concentración de 200 μ g/ml y se incuba durante 90 min más. Por último se centrifuga el cultivo a 9000 rpm durante 15 min para recoger las células y se guardan a -20°C.

Para la sobreexpresar la proteína RuvB se inocula una colonia de *B. subtilis* BG214 que contiene un derivado del plásmido pDG148 con el gen *ruvB* con una cola de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal, en medio LB y se deja crecer a 37°C con agitación hasta una $D.O_{560} = 0,4$. En ese momento se induce la expresión de la proteína mediante adición de IPTG a 0,2 mM y se incuba el cultivo a 18 °C durante 16h. Al día siguiente se recoge la masa celular mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 min y se conserva a -20°C.

2.3.2. Purificación de proteínas

Purificación de RuvA

La masa celular se resuspende en tampón F (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol,) y 100mM KCl y se lisan mediante sonicación. El lisado celular se centrifuga a 18000 rpm durante 30 min. En estas condiciones RuvA permanece en la fracción soluble. Se añade PEI para precipitar el ADN y RuvA. Se hacen lavados a 100 mM de KCl para eliminar contaminantes y finalmente se solubiliza RuvA a 300 mM de KCl. A esta fracción soluble se añade 15 mM tampón fosfato y se carga en una columna de hidroxapatita equilibrada con buffer F, 300 mM KCl y 15 mM tampón fosfato. Se lava la columna con concentraciones crecientes de tampón fosfato y se eluye la proteína a 250 mM de tampón fosfato. La elución se dializa para disminuir la concentración de KCl hasta 50 mM y se carga en una columna Q sefarosa equilibrada con tampón F y 50 mM tampón fosfato. Se lava la columna con concentraciones crecientes de KCl y se eluye la proteína a 300 mM KCl. Finalmente se dializa frente a 50mM Tris-HCl, 1mM DTT, 1 mM DTT, 50% glicerol, 300 mM NaCl y se conserva a -20°C.

Purificación de RuvB

La masa celular se resuspende en tampón G (50 mM KP pH 7,5, 30 mM Imidazol, 5 mM β -mercaptoetanol, 10% Glicerol) y 500 mM NaCl. Las células de *B. subtilis* se lisan mediante adición de lisozima a 0,1 mg/ml, incubando 60 min a 4 °C y posteriormente por sonicación. El lisado celular se centrifuga a 18000 rpm durante 30 min. La proteína RuvB permanece soluble en el sobrenadante y se carga en una columna de Níquel equilibrada con tampón G y 30 mM Imidazol. Para eliminar contaminantes se hacen lavados a la columna con concentraciones crecientes de Imidazol. La proteína eluye entre 200 y 400 mM Imidazol. La elución se dializa para bajar la concentración de NaCl hasta 200 mM. Y se carga en una columna Q sefarosa equilibrada con tampón H y 200 mM NaCl. Se lava la columna con concentraciones crecientes de NaCl y se eluye la proteína a 500 mM NaCl. Por último se dializa frente a 50mM Tris-HCl, 1mM DTT, 1 mM DTT, 50% glicerol, 300 mM NaCl y se conserva a -20°C.

Purificación de RecU

La masa celular se resuspende en tampón H (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol) y 300 mM NaCl. Las células de *E. coli* se lisan por sonicación y el lisado se centrifuga a 18000 rpm durante 30 min. La proteína RecU permanece mayoritariamente en el sobrenadante. Se añade PEI para precipitar el ADN. La proteína permanece en los sobrenadantes de PEI y se precipita con sulfato amónico (SA) al 70%. El precipitado de SA se carga en una columna de fosfocelulosa equilibrada con tampón H y 100 mM NaCl. Se eliminan contaminantes con lavados a concentraciones crecientes de NaCl. Se eluye la proteína con tampón H, que

contiene 500 mM NaCl. La elución se diluye hasta 200 mM NaCl y se carga en una columna de ADN agarosa equilibrada con tampón H y 200 mM NaCl. Se lava la columna hasta 300 mM NaCl y se eluye la proteína con 1 M NaCl. Se dializa frente a 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 50% glicerol y 300 mM NaCl y se conserva a -20°C .

2.3.3. Identificación de proteínas y determinación de la masa molecular

Una vez purificadas las proteínas se identificaron mediante digestión con tripsina y espectrometría de masas MALDI-TOF por el servicio de proteómica del CNB.

Para determinar el estado de oligomerización de las proteínas se incuban dichas proteínas en presencia de un agente entrecruzador, el DSS. El DSS forma uniones covalentes (de 11.4 Å de longitud) entre aminas primarias presentes en residuos de lisina (Tsudó *et al.* 1987). La reacción se lleva a cabo incubando durante 10 min a 37°C $1\mu\text{M}$ de cada proteína en tampón A, 50 mM NaCl y $125\mu\text{M}$ de DSS. Se para la reacción añadiendo tampón de carga y se analizan las muestras en geles SDS-PAGE al 10%.

2.4. Ensayos *in vivo*

2.4.1. Viabilidad frente a MMS

Para analizar los posibles defectos en reparación del ADN por recombinación de las distintas cepas de *B. subtilis*, se llevan a cabo ensayos de viabilidad frente a drogas que dañan el ADN, como es el metilmetano sulfonato (MMS). Para ello se crecen en cultivo líquido las distintas cepas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. En ese momento se añade al cultivo MMS a 10 mM y se toman muestras a distintos tiempos. Las alícuotas se plaquen en LB agar y se hace un recuento del número de colonias.

2.4.2. Medida de la frecuencia de recombinación

Todas las cepas de *B. subtilis* a analizar son auxótrofas para metionina, por lo que en el caso de la transformación cromosomal se utiliza ADN cromosómico de la cepa protótrofa SB19. En el caso de la transformación plasmídica se utiliza el plásmido pUB110, que porta la resistencia a neomicina. Tanto la frecuencia de recombinación cromosomal (*met*⁺) como plasmídica (*Neo*^R) se miden en relación al número de células competentes de *B. subtilis* (*met*⁺, *Neo*^R) transformantes que son capaces de formar colonias en placas de medio mínimo carentes de metionina o placas de LB conteniendo neomicina (Alonso *et al.* 1988). En ambos casos se normalizan los datos en función de la viabilidad de las cepas y respecto a los valores de la cepa salvaje (Alonso *et al.* 1988).

2.4.3. Microscopía óptica de fluorescencia

Para llevar a cabo la tinción de los nucleoides con DAPI se crecen cultivos de las distintas cepas a partir de colonia en placa fresca en medio líquido LB a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanza la fase exponencial se recoge 1 ml de muestra. Las células se fijan mediante la incubación paraformaldehído al 2% y se recogen mediante centrifugación a 6000 rpm durante 3 min. Se lava el precipitado con PBS 1X y se vuelve a resuspender en 50 µl. Se toma una muestra de 5 µl y se deposita en un portaobjetos pretratado con poli-lisina. Se añade una gota de DAPI a 0,2 µg/ml y una gota de medio de montaje Vectashield.

2.4.4. Inmunodetección de la expresión de la proteína RecU *in vivo* y cálculo de la vida media

Aguas arriba del gen *recU* hay un promotor inducible por vancomicina pero no se detecta una región diana del represor LexA, el cual se autodegrada al inducirse la respuesta SOS por adición de mitomicina C.

Se crece un cultivo de *B. subtilis* BG214 a partir de colonia durante 16 h a 37 °C con agitación. Al día siguiente se diluye 1/100 o 1/200 en 20 ml de medio fresco LB para dejar a una $D.O_{560} \sim 0,05$. Se deja creciendo en las mismas condiciones hasta que el cultivo alcanza una $D.O_{560} = 0,6 - 0,8$. En ese momento se añade a una fracción del cultivo 2-4 µg/ml de vancomicina o 0,5-1 µg/ml de mitomicina C, se incuba durante 30 min más y se toman muestras de 2 ml.

Se desconoce la concentración de la proteína RecU y su vida media. Cuando el cultivo alcanza una $D.O_{560} = 0,6 - 0,8$, se añade 100 µg/ml de rifampicina (bloquea la síntesis *de novo*) y se toman muestras de 2 ml a distintos tiempos.

Las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en 100 µl de tampón 50mM Tris HCl pH7,5, 1mM EDTA, 0,5% SDS, 150 mM NaCl y 1mg/ml de lisozima. Se incuba 30 min a 37°C y posteriormente las células se lisan mediante sonicación. Tras la sonicación, el lisado se centrifuga a 14000 rpm durante 30 min. Del sobrenadante, 50 µl se cargan en un gel SDS-PAGE al 15%. Posteriormente se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF para su inmunodetección usando como anticuerpos primarios anticuerpos policlonales anti-RecU y como anticuerpos secundarios, anticuerpos anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. El revelado se lleva a cabo usando el kit LiteAblot de Euroclone.

2.5. Ensayos *in vitro*

2.5.1. Ensayos de unión a estructuras de Holliday

Los complejos de ADN – proteína se analizan mediante ensayos de retardo en gel. El ADN libre de proteínas migra de forma más rápida en un gel de poliacrilamida nativo (nPAGE). En cambio, si el ADN está acomplejado con una o varias proteínas migra de forma más lenta.

Para llevar a cabo la reacción se incubaba el ADN marcado radiactivamente en el extremo 5' junto con la(s) proteína(s). Las condiciones de la reacción varían dependiendo de la proteína que se trate. En el caso de RecU, se incuban concentraciones crecientes de proteína con el ADN en tampón A (que contiene 1 mM $MgCl_2$) y 50 mM NaCl en un volumen de 20 μ l, durante 15 min a 37°C. Las muestras se cargan en un gel ndPAGE al 6% en tampón TAE 1X. La electroforesis se deja corriendo a temperatura ambiente durante 2 h a 180V. Posteriormente se seca el gel y se revela mediante autorradiografía. En el caso de RuvA la reacción, de 20 μ l de volumen, se hace en tampón E (que contiene 5 mM EDTA) y 50 mM NaCl y se incubaba durante 20 min a 37°C. Las muestras se separan en nPAGE al 6% en tampón 6,7 mM Tris-HCl pH8, 3,3 mM acetato sódico y 2mM EDTA y se deja corriendo a temperatura ambiente durante 2 h a 180V. El revelado se hace mediante autorradiografía.

2.5.2. Ensayos de corte de estructuras de Holliday

Se incubaba el ADN marcado radiactivamente en presencia de RecU (100 y 300 nM), en tampón C (que contiene 10 mM $MgCl_2$) y 50 mM NaCl. La reacción, de 10 μ l de volumen, se incubaba durante 30 min a 37°C y se para añadiendo 9 μ l de tampón desnaturalizante que contiene formamida y 25 mM EDTA. Las muestras se separan en dPAGE al 15% - urea 6M y se deja corriendo durante 2,5 h a 1600V. El revelado se hace mediante autorradiografía.

Cuando las reacciones se analizan en geles nativos, las muestras se separan en nPAGE al 6%, se deja corriendo durante 2h a 180V y se revela mediante autorradiografía.

En el caso de la reacción de corte de HJs largas, la estructura-X purificada se incubaba en presencia de la(s) proteína(s), en tampón B (que contiene 10 mM $MgCl_2$) y 50 mM NaCl en un volumen de 20 μ l, durante 60 min a 37°C. Posteriormente se desproteíniza la reacción mediante la adición de proteinasa K (2 μ g), SDS (1%) y EDTA (25 mM) y se deja incubando durante 20 min más. Las muestras se cargan en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X y se deja corriendo durante 16h a 80V. El ADN se visualiza mediante tinción del gel con bromuro de etidio.

Cuando la reacción se hace en presencia de RuvB, se añade además 1mM de ATP o ATP γ S.

2.5.3. Ensayos de distorsión de estructuras de Holliday

La generación de las seis especies de HJ utilizadas, las cuales presentan distintos sitios de restricción en cada una de las ramas, se realiza mediante digestión de la HJ original con enzimas de restricción. Cada rama de la HJ presenta un sitio de corte para una enzima de restricción (BamHI: B, EcoRI: R, HindIII: H, XbaI: X). Cada especie se genera mediante digestión doble y el nombre viene dado por las dos ramas largas que quedan. La movilidad de cada especie depende del ángulo que formen las ramas en presencia de RecU en presencia de Mg^{2+} o EDTA.

La reacción, de 20 μ l de volumen, se lleva a cabo incubando la proteína RecU salvaje (3 nM) en tampón A (que contiene 1 mM $MgCl_2$) o las variantes de RecU (75 nM) en tampón B que contiene 10 mM $MgCl_2$) con las 6 especies de HJs y 50 mM NaCl durante 15 min a 37°C. Las muestras se separan en nPAGE al 6% en tampón TA en presencia de 2 mM EDTA o de 200 μ M de $MgCl_2$ y se deja corriendo durante 16 h a 80V. Posteriormente se seca y el gel y se revela mediante autorradiografía.

2.5.4. Ensayos de unión a filtros de nitrocelulosa

El ADNcd atraviesa el filtro de nitrocelulosa y el ADNcs no se queda retenido en los filtros de nitrocelulosa tratados con KOH. Independientemente del tratamiento las proteínas debido a sus cargas, no atraviesan un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μ m. Esta técnica permite medir la estabilidad de los complejos ADN – proteína. El ADNcs y el ADNcd no se quedan retenidos en filtros de nitrocelulosa tratados con KOH. Sin embargo, si el ADN está unido a proteínas se queda retenido en el filtro. Se tratan con KOH a 0,5 M filtros de nitrocelulosa de 0,45 μ m de tamaño de poro, de manera que se bloquea la unión del ADNcs a los filtros. Se lava con abundante agua y se conservan en tampón Tris HCl pH 7,5 a 100 mM.

La proteína RecU salvaje (20 nM) o las variantes de RecU (100 nM) se incuban con HJ marcada radiactivamente durante 15 min a 37°C, en tampón B y 50mM NaCl, en un volumen de reacción de 20 μ l. Pasado el tiempo de incubación se añade 50 veces de exceso de ADN competidor, que es un ADNcs inespecífico (pGEMcs), diluido en 180 μ l de tampón Tris-HCl 50mM pH7,5 , EDTA 1 mM. Se sacan alícuotas de 200 μ l a distintos tiempos, se filtran mediante vacío y se secan los filtros en una estufa. Posteriormente se introducen en tubos con líquido de centelleo y se miden las cuentas por min (cpm) en un contador de centelleo.

2.5.5. Ensayos de renaturalización del ADN

El ADNcs que se utiliza como sustrato se obtiene digiriendo ADN plasmídico pGEM 3Zf(+) con las enzimas de restricción EcoRI y DraIII. De esta manera se obtiene un ADNcd de 420 pb, que se purifica y se marca radiactivamente usando [$\alpha^{32}P$]- dATP. Posteriormente se desnaturaliza el ADNcs mediante incubación a 95°C durante 10 min e inmediatamente después se guarda en hielo para evitar la renaturalización espontánea.

Se incuba el ADNcs en presencia de RecU salvaje o las variantes de RecU (200 y 500 nM) en tampón A, con 50 mM NaCl en un volumen de 20 μ l, durante 15 min a 37°C. Posteriormente se desproteiniza la reacción mediante la adición de proteinasa K (2 μ g), SDS (1%) y EDTA (25 mM) y se deja incubando durante 20 min más. Las muestras se separan en nPAGE al 6% en tampón TBE 0,5X y se deja corriendo durante 2 h a 180V. El revelado se hace mediante autorradiografía.

2.5.6. Ensayos de migración de ramas de estructuras de Holliday

Para medir la actividad helicasa de RuvB, se incuba HJ marcada radiactivamente en presencia de RuvB en tampón I con 50 mM NaCl y ATP 1 mM, durante 5 min a 37°C. Después se añade la proteína RuvA a distintas concentraciones y se incuba durante 30 min más. Las muestras se separan en nPAGE al 6% en tampón TAE 1X y se deja corriendo durante 2 h a 180V. Se revela mediante autorradiografía.

2.5.7. Medida de la actividad nATPasa

La actividad dATPasa de RecA dependiente de ADNcs se determina midiendo la cantidad de ADP libre obtenido después de la hidrólisis de [$\alpha^{32}\text{P}$]- dATP más dATP frío (1:500000) (Ayora *et al.* 1999). La proteína RecA (1,3 μM) se incuba en tampón D (que contiene 10 mM MgOAc) y 50 mM NaCl en presencia de 10 μM ADNcs circular pGEM 3Zf(+). La concentración final de dATP es de 2 mM. La reacción, de 20 μl de volumen final, se incuba durante 5 min a 37°C. Después se añade RecU salvaje o las distintas variantes de RecU (200 nM) y se incuba en las mismas condiciones. En la reacción inversa, primero se incuba RecU o las variantes de RecU durante 5 min a 37°C y luego se añade RecA. Se sacan alícuotas de 20 μl a distintos tiempos a las que se añade 0,1M de EDTA para parar la reacción. Posteriormente se realiza una cromatografía de capa fina con tampón fosfato potásico pH 7,5 200 mM. Para la visualización y cuantificación se utiliza Phosphorimager (BioRad), usando el programa informático Quantity One (BioRad).

La actividad ATPasa de RuvB se determina midiendo la cantidad de fosfato inorgánico libre después de la hidrólisis de [$\gamma^{32}\text{P}$]- ATP. La proteína RuvB (40 nM) se incuba en tampón I (que contiene 10 mM MgOAc) y 50 mM NaCl en presencia de ADNcd superenrollado (150 μM). La concentración final de ATP es de 1 mM. La reacción, de 20 μl de volumen final, se incuba durante 5 min a 37°C. Después se añade RuvA a distintas concentraciones. Se para la reacción añadiendo 0,1 M EDTA y se realiza una cromatografía de capa fina en 0,4M de KH_2PO_4 .

2.5.8. Ensayos de intercambio de cadenas

Los sustratos que se utilizan son ADNcd de pGEM 3Zf(+) digerido con *KpnI* y ADNcs de pGEM 3Zf(+). La proteína RecA (1,3 μM) se incuba en tampón D y 50 mM NaCl, en presencia de 20 μM (en mol de nt) de ADNcd , 10 μM (en mol de nt) de ADNcs y 2 mM de dATP durante 30 min a 37°C. Después se añade RecU o las variantes de RecU (400 nM) y se incuban 30 min más. En la reacción inversa, primero se incuba RecU o las variantes de RecU durante 30 min a 37°C y posteriormente se añade RecA. Las muestras se desproteinizan mediante incubación con proteinasa K (2 μg) y SDS (1%) durante 20 min a 37°C, se separan en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE 1X y se deja correr durante 16h a 60V. El ADN se visualiza mediante tinción del gel con bromuro de etidio.

2.5.9. Ensayos de interacción proteína – proteína

Para analizar interacciones *in vitro* entre proteínas, combinaciones de éstas se incuban en presencia del agente entrecruzador DSS. En el caso de la reacción entre RecU y RecA, se incuban las proteínas (ambas a 2 μ M) en tampón A y 50 mM NaCl. En el caso de la reacción entre RecU y RuvB se incuban las proteínas (ambas a 1 μ M) en tampón I (que contiene 10mM MgOAc₂) y 80 mM de NaCl, en presencia de 2 mM de ATP.

Las reacciones se incuban durante 10 min a 37°C en presencia de 125 μ M de DSS y se cargan en un gel SDS-PAGE al 10 %. El revelado se hace mediante inmunodetección usando anticuerpos policlonales contra las proteínas.

2.5.10. Microscopía de fuerzas atómicas

El ADN que se usa como sustrato es la HJ que se genera *in vivo* procedente del plásmido pSD115. Se diluyen alícuotas del ADN sustrato en tampón Tris-HCl pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, 50 mM NaCl y se depositan sobre una superficie de mica. Se incuban durante 15 min a temperatura ambiente, se lavan las preparaciones con agua mili-Q y se secan con nitrógeno.

El ADN sustrato se incuban en presencia de RecU (20 nM en moles de dímero) o RuvA (20 nM en moles de tetrámero) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y 50 mM NaCl. Cuando RuvB (5 nM en moles de hexámero) está presente en la reacción se añade además 1 mM ATP γ S. Las reacciones se incuban durante 10 min a 37°C. Las muestras se depositan en una superficie de mica, se incuban durante 15 min a temperatura ambiente, se lavan con agua mili-Q y se secan con nitrógeno.

Las imágenes de AFM se realizan en aire usando el modo de contacto en microscopio Nanoscope IIIa (Digital Instruments). El cantilever que se usa (OMCL-AC160TS-W2, Olympus) es de 160 μ m de largo con 42 N/m constante. La frecuencia de escaneo es de 300 KHz, y las imágenes capturadas se aplanan y se analizan mediante el programa informático Nanoscope Veeco V531r1 asociado al módulo del aparato.

Se mide la altura del ADN (en el centro o en los brazos de la HJ) siempre en dirección perpendicular y los anchos de las moléculas de ADN o de ADN + proteína a la mitad de la altura, para eliminar variabilidad introducida en los valores por la punta. Los datos se grafican en histogramas de frecuencia de altura del ADNcd (en nm) y se analizan a través del ajuste de curva gaussiano para obtener el valor medio, utilizando el programa informático Origin 8.0.

RESULTADOS

A. ANALISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA RESOLVASA RecU

1. Análisis de la expresión del gen de *recU*

1.1. En *B. subtilis* la proteína RecU se sintetiza como un polipéptido de 23,9 kDa

El gen *recU* posee dos potenciales codon de iniciación, llamados arbitrariamente codón 1 y 33. En las bases de datos un gran número de autores consideran al segundo ATG (posición 33) como posible primer residuo de la proteína que llaman RPU (por “*recombination protein U*”) (Fig. 10). Para determinar cual de los dos posibles sitios de inicio de la traducción en el gen de *recU* (codón 1 o codón 33) funciona *in vivo*, y descartar si había un procesamiento de la proteína se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en extractos celulares de *B. subtilis* WT. Para ello se creció un cultivo hasta alcanzar la fase exponencial y se añadió rifampicina para bloquear la transcripción *de novo*. Se recogieron muestras a distintos tiempos, se procesaron y se analizaron mediante western blot usando anticuerpos policlonales contra RecU (Fig. 14).

Se utilizó como control la proteína salvaje y un mutante en el gen de *recU* que carecía de los primeros 32 codones, denominado RecU Δ 1-32. Esta variante es la que se sintetizaría desde el segundo posible sitio de inicio de la traducción y da lugar a una proteína de 174 aa y 20,3 kDa (RPU). Se utiliza este mutante como control en el ensayo de inmunodetección y para el posterior análisis bioquímico.

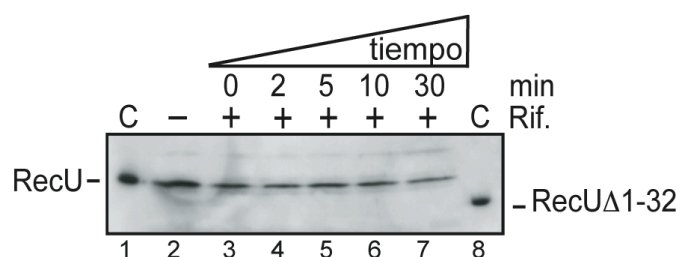


Figura 14. Detección *in vivo* de la síntesis de RecU. Se añadió rifampicina a 200 μ g/ml a un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se recogieron muestras a distintos tiempos y se analizaron mediante western blot. C: control de migración de las proteína purificada RecU o RecU Δ 1-32.

En extractos celulares de *B. subtilis* sólo se observa la síntesis de un tipo de proteína, que corresponde con un polipéptido que migra a la altura de la forma larga de RecU (23,9 kDa). En ningún caso se detecta la forma corta de la proteína o RPU (Fig.14). La no detección de ésta última no se debe a un defecto en el reconocimiento de la proteína por parte del anticuerpo ya que éste reconoce con la misma eficiencia a la proteína mutante RecU Δ 1-32 (Fig. 14). Tras la adición de rifampicina, la cantidad de RecU sólo se reduce ligeramente, lo que indica una vida media relativamente alta, de más de 30 min. Tampoco se detecta un procesamiento de la variante de 23,9 kDa dando lugar a una nueva especie de 20,3 kDa (RPU) (Fig. 14). Por todo ello se considera que la hipótesis sobre la existencia de RPU es incorrecta.

Se calculó además el número de moléculas de RecU en la célula. Para ello se crecieron células de *B. subtilis* BG 214 hasta la fase exponencial de crecimiento, se recogieron y se lisaron. Se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10 % muestras equivalentes a un ml de cultivo. Mediante una recta patrón se calcularon los ng totales de proteína por ml de cultivo, y de ahí la concentración de proteína por célula. Se determinó que en células en crecimiento exponencial hay $\sim 3500 \pm 240$ moléculas por célula, que equivale a una concentración de $\sim 4,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Volumen de una célula de *B. subtilis* $1,2 \times 10^{-15}$ L).

1.2. La síntesis de RecU aumenta en situaciones de estrés sobre la membrana celular y no durante la respuesta SOS

El operón *recU-ponA* forma parte del regulón σ^M y se activa bajo condiciones de estrés sobre la membrana celular, como por ejemplo niveles altos de ácidos, etanol o estrés oxidativo (Eiamphungporn and Helmann 2008). También se activa por exposición a antibióticos como la vancomicina, que es un inhibidor de la síntesis de peptidoglicanos. Está descrito que la exposición a Vancomicina en *B. subtilis* aumenta 2,8 veces la expresión a partir del promotor del operón *recU-ponA*.

Para comprobar si la expresión del gen de *recU* estaba regulada por el promotor σ^M y si esto se traduce en un aumento del número de moléculas de RecU, se añadió Vancomicina a un cultivo de *B. subtilis* en fase exponencial. Se incubó el cultivo en presencia del antibiótico durante 30 min y se recogieron las muestras. La detección de la proteína RecU en los extractos celulares se hizo mediante western blot (Fig. 15), usando anticuerpos policlonales contra RecU. Se determinó que en presencia de vancomicina hay 2-3 veces más RecU (8750 ± 1750 moléculas por célula) (Fig.15).

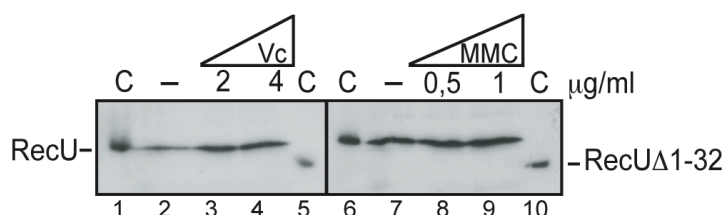


Figura 15. Análisis de la inducción en la síntesis de RecU por adición de Vancomicina y MMC. Se añadió Vancomicina a 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ o MMC a 0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ a un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Tras 30 min de incubación se recogieron las células, se procesaron y las muestras se analizaron mediante western blot. C: control de migración de la proteína purificada RecU o RecU Δ 1-32.

La expresión de los genes *ruvA* y *ruvB* se induce después de una exposición a daño en el ADN producido por Mitomicina C (MMC), ya que forman parte de la respuesta SOS, pero no la expresión del gen *recU* (Au *et al.* 2005). Para descartar que la respuesta SOS no modifica los niveles de RecU (inducción o represión de alguna proteasa) se midieron los niveles de RecU en condiciones de inducción del sistema SOS. Se comprobó que el número de moléculas de RecU no se incrementa por adición de MMC (Fig. 15).

Como en ninguno de los casos se observa síntesis de RPU se puede concluir que la forma activa de la proteína que funciona *in vivo* es la del polipéptido sintetizado a partir del primer codón, que corresponde con 23,9 kDa. Para determinar de una manera directa si RPU, la cual carece de la tétrada conservada NRGM (ver Fig. 10), juega algún papel en la resolución de HJ se analizó el papel de la región N-terminal de RecU.

2. Papel de la región N-terminal en la actividad catalítica de RecU y en interacción con RuvB

2.1. La región N-terminal es esencial para la reparación del ADN por recombinación homóloga

Para determinar cual era la importancia de la región N-terminal en la actividad de RecU, se diseñaron y construyeron mutantes en dicha región y se analizó la capacidad de reparación del ADN tras una exposición a daño de las distintas cepas mutantes (Fig. 16). Para ello se construyó un mutante de delección *recU* Δ 1-32, así como también mutantes puntuales. Estos mutantes incluyen el mutante puntual *recU*5, en el que el residuo conservado Prolina 5 ha sido sustituido

Resultados

por una Alanina, el mutante puntual *recU31*, en el que el residuo Arginina 31 (de la téttrada NRG^M) ha sido sustituido por una Alanina y el mutante *recUΔ1-32*.

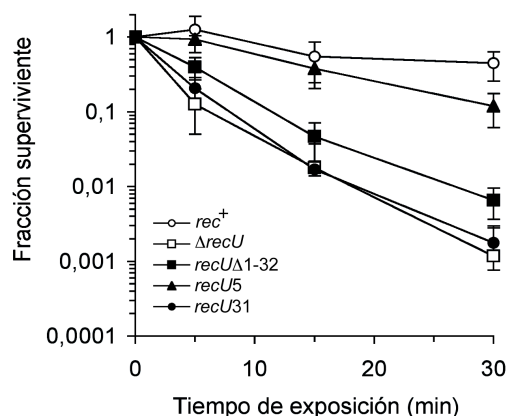


Figura 16. Curvas de supervivencia de las cepas mutantes en la región N-terminal de RecU tras la exposición a 10 mM de MMS. Se añadió MMS a 10 mM a cultivos en fase exponencial de las cepas *rec*⁺, *ΔrecU*, *recUΔ1-32*, *recU5* y *recU31*. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se contó el número de células supervivientes.

El mutante nulo en *recU* es muy sensible a una exposición a daño en el ADN causado por agentes alquilantes como es el MMS (Fig. 16, Sánchez *et al.* 2005). Los mutantes de delección *recUΔ1-32* y *recU31* están altamente afectados y el número de células supervivientes cae de 10^3 a 10^4 veces comparado con la cepa WT. Esto sugiere una importante función de la región N-terminal para la correcta función de RecU. En cambio el mutante puntual *recU5* se encuentra ligeramente afectado, lo que indicaría que la mutación no está afectando a la actividad de la proteína.

Por otro lado, una cepa *ΔrecU* se caracteriza por presentar un incremento de hasta 80 veces en la proporción de células anucleadas ($\sim 4\%$) comparado con la cepa *rec*⁺ ($\sim 0,05\%$) (Carrasco *et al.* 2004) lo que indica que esta cepa presenta un defecto en la segregación de los cromosomas. Para comprobar si las cepas mutantes tenían un defecto en segregación cromosomal, se llevó a cabo la tinción de nucleoides con DAPI de las distintas cepas (Fig. 17).

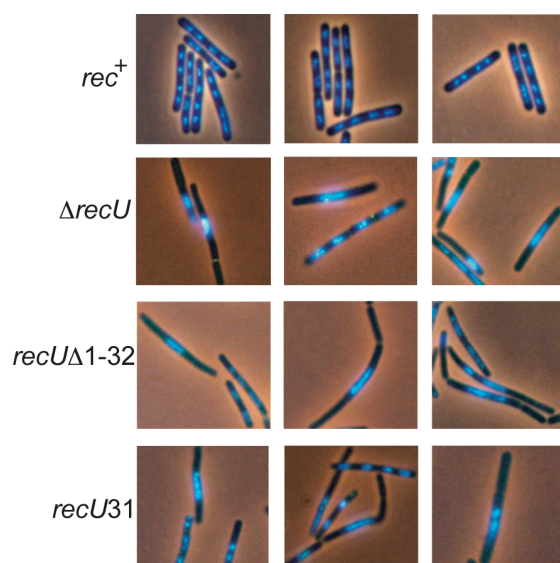


Figura 17. Segregación de nucleoides en cepas mutantes en la región Nter de RecU. Las cepas *rec⁺*, *ΔrecU*, *recUΔ1-32* y *recU31* en fase exponencial de crecimiento se fijaron, se tiñeron los nucleoides con DAPI y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

Las cepas *recUΔ1-32* y *recU31* presentan un defecto en segregación similar al de la cepa *ΔrecU*, con $\sim 4\%$ de células anucleadas, lo que confirma que esta región es esencial para la actividad de RecU.

2.2. La región N-terminal se requiere para la actividad de corte de RecU

Para analizar las actividades bioquímicas asociadas con la región N-terminal se construyó un nuevo mutante, *recUΔ1-29*, que carece de los primeros 29 aa, pero que sí presenta la tétrada NRGM y se purificó la proteína siguiendo un protocolo similar al de la proteína RecU WT. Se analizó la actividad bioquímica de este mutante y se comparó la actividad con la de las proteínas RecUΔ1-32 y RecUR31A, cedidas por Begoña Carrasco.

RecU une HJs con una alta afinidad, presentando una constante aparente de unión (K_{app}) de $0,8 \pm 0,2$ nM (Ayora *et al.* 2004). El mutante RecUΔ1-29 tiene una afinidad de unión similar al de la proteína WT (Fig. 18a). Se muestran también los ensayos de unión para los mutantes RecUΔ1-32 y RecUR31A (figura de Begoña Carrasco). Las tres proteínas mutadas muestran una $K_{app} = 0,6 - 1$ nM, similar al de la proteína WT.

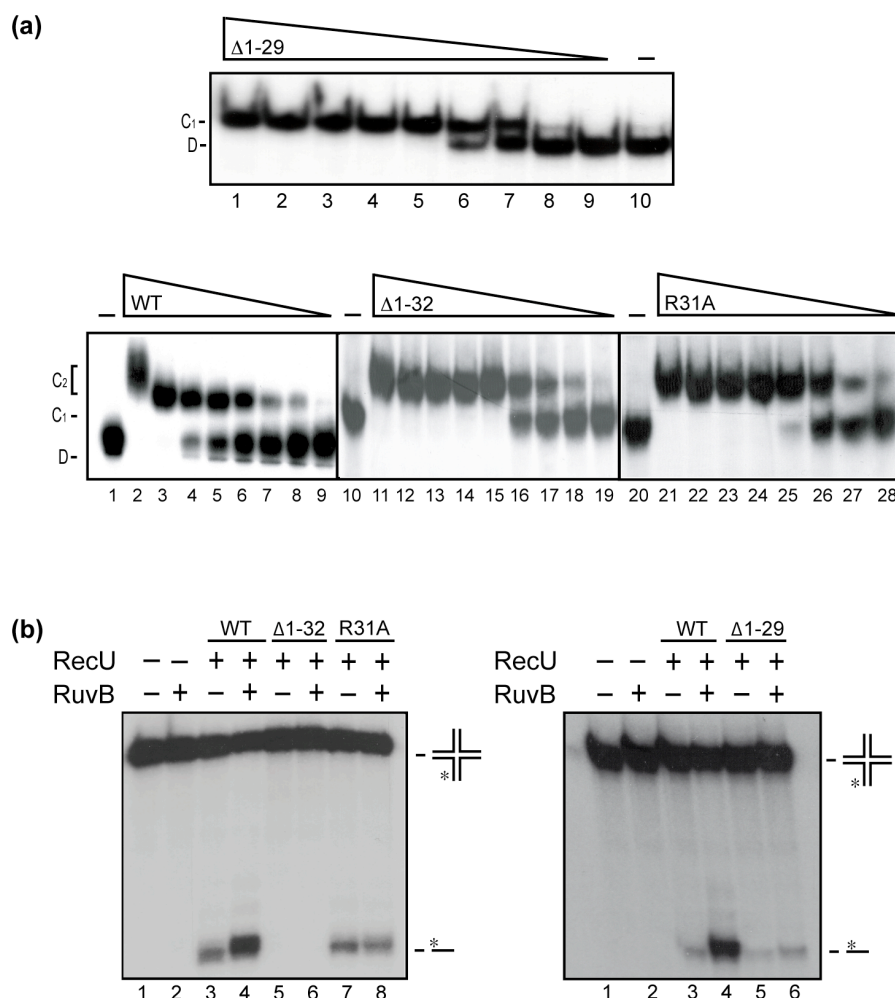


Figura 18. Especificidad de unión y capacidad de corte de HJ de las variantes de RecU en la región N-terminal. (a) Unión a HJs. La estructura sintética HJ3 (0,1 μ M en mol de nt) que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5', se incubó con cantidades crecientes de RecU Δ 1-29 (0,12 a 32 nM), RecU (0,12 a 16 nM), RecU Δ 1-32 (0,12 a 32 nM) o RecUR31A (0,25 a 32 nM) en tampón A, que contiene 1 mM MgCl₂, durante 15 min a 37° C. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6% y se reveló por autorradiografía. D: ADN libre; C1-C2: complejos ADN-proteína con distinto nivel de migración. **(b)** Reacción de corte de HJs en presencia y ausencia de RuvB. La estructura HJ3 (0,1 μ M en mol de nt) que contiene el oligonucleótido JO 3.2 marcado en el extremo 5' se incubó con las distintas variantes de RecU (100 nM) en presencia o ausencia de RuvB (40 nM) y en presencia de 1 mM de ATP γ S. Se incubó la reacción en tampón C que contiene 10 mM MgCl₂, durante 30 min a 37° C. Las muestras se analizaron mediante dPAGE al 15% y se reveló por autorradiografía. Los signos + y - indican respectivamente presencia y ausencia de proteína. Las concentraciones de RecU se expresan en mol de dímero y las de RuvB en moles de hexámero.

A continuación se estudió la capacidad de corte de los mutante RecU Δ 1-32, RecU Δ 1-29 y RecUR31A (Fig. 18b). El mutante RecUR31A es capaz de resolver la HJ con la misma eficiencia que la proteína RecU WT. RecU Δ 1-29 y RecU Δ 1-32, aunque unen HJs con una alta especificidad no son capaces de llevar a cabo la resolución de la misma. Se midió la estabilidad del complejo ADN-proteína mediante ensayos de filtro de nitrocelulosa y se confirmó que ambos mutantes forman complejos inestables con la HJ (vida media < 2 min). Los resultados obtenidos sugieren un papel esencial de la región N-terminal en la estabilidad del complejo proteína-HJ y por tanto en la función catalítica de RecU y explica el defecto de la cepa mutante *recU* Δ 1-32 observado en segregación de los nucleoides (ver Fig. 17) y la sensibilidad a MMS (ver Fig. 16). Sin embargo no explican el defecto del mutante RecUR31A que tiene un fenotipo similar a de las deleciones, aunque corta HJs.

2.3. La región N-terminal está implicada en la interacción con RuvB

La proteína RecU tiene dos actividades: en una acción concertada con RuvB cataliza el corte de HJs y modula las actividades de RecA. Por razones que se discutirán más adelante se ha descartado que RecUR31A estuviese afectado el papel modulador de RecA. Además, en estudios anteriores se ha mostrado que una interacción específica entre las proteínas RuvC y RuvB de *E. coli* y que ésta estimulaba la reacción de resolución de HJ en presencia de ATP γ S (van Gool *et al.* 1998). Para comprobar si esto sucedía en el caso de las proteínas RecU y RuvB de *B. subtilis*, se llevó a cabo la reacción de corte de HJ en presencia de RuvB y de ATP γ S (Fig. 18b). Como en *E. coli*, RuvB de *B. subtilis* es capaz de estimular la reacción de corte llevada a cabo por RecU (Fig. 18b, calle 4). En cambio no es capaz de estimular el corte llevado a cabo por el mutante RecU Δ 1-32 (Fig. 18b, calle 6) ni RecUR31A (Fig. 18b, calle 8). En cambio RuvB es capaz de estimular la reacción de corte de RecU Δ 1-29 (Fig. 18b, calle 14). Este resultado indicaría que la región N-terminal además de ser esencial para la actividad de corte de RecU, podría contener el dominio de interacción con RuvB, donde la tétrada NRGM podría estar directamente implicada. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de interacción entre RuvB y las distintas variantes de RecU usando un agente entrecruzador, el Disuccinimidil suberato (DSS) (Fig. 19). El DSS forma enlaces no reversibles de 11,4 Å de longitud (8 átomos) entre grupos de aminos primarios presentes en residuos de Lisina (Eggleston *et al.* 1997).

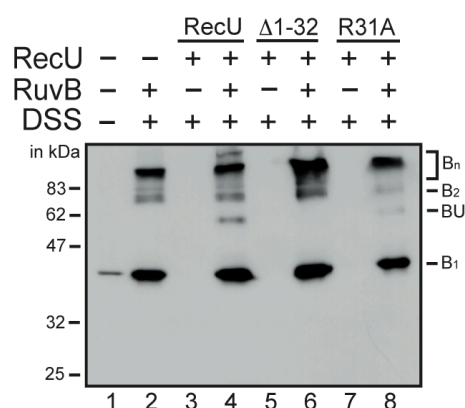


Figura 19. Interacción entre RuvB y las variantes de RecU de la región N-terminal. Las distintas variantes de RecU (0,8 μ M) se incubaron con RuvB (0,6 μ M) en tampón I que contiene 10 mM MgOAc₂ con 90 mM NaCl y 2 mM ATP, durante 10 min a 4°C. Se añade DSS a 125 μ M y se incubó la reacción durante 10 min más a 37°C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante western blot usando anticuerpos anti-His (anti-RuvB). - y + indican respectivamente ausencia y presencia de proteína o DSS. B₁, B₂, B_n indican los distintos estados oligoméricos de RuvB (monómero, dímero, etc). BU indica el complejo formado por RecU y RuvB.

En un gel SDS-PAGE, RuvB migra mayoritariamente a una altura intermedia entre los marcadores de 32 y 47 kDa (Fig. 19, calle 1), lo que coincide con el peso molecular del monómero, que es 37,5 kDa. En presencia de DSS, además de la banda mayoritaria se observan unas bandas minoritarias, que podrían corresponder con distintos estados oligoméricos de la proteína, como son 83 kDa (B₂) y > 175 kDa (B_n) (calle 2). Cuando se incubó RecU WT y RuvB en presencia de DSS, se detecta una nueva banda, de ~62 kDa (BU), que es reconocida por los anticuerpos anti-His (indirectamente anti-RuvB) y anti-RecU (Fig. 19, calle 4). Esta banda podría estar compuesta por un monómero de RecU (24 kDa) y un monómero de RuvB (37,5 kDa).

Por el contrario, cuando se incubó la variante RecU $\Delta 1-32$, la banda que correspondería con el complejo BU no se detecta (Fig. 19, calle 6) y en el caso de la variante RecUR31A se encuentra disminuida de 3 a 5 veces (Fig. 19, calle 8). Este resultado indica que (i) existe una interacción directa entre RecU y RuvB y (ii) el dominio N-terminal de RecU parece estar implicado en la interacción entre las dos proteínas y (iii) la proteína RPU si existiese sería incapaz de resolver HJs y de interaccionar con RuvB.

El hecho de que RuvB no interaccione con las proteínas mutantes RecU $\Delta 1-32$ y RecUR31A explica la no estimulación en la reacción de corte de HJ en estos mutantes (ver Fig. 18b). Esta interacción tendría importancia *in vivo*, ya que aunque la proteína mutante RecUR31A es capaz de unir y resolver HJs con la misma eficiencia que la proteína WT, la cepa que porta esta mutación es muy sensible a MMS (ver Fig. 16) y presenta un defecto en segregación cromosomal (ver Fig. 17).

3. La región del tallo está implicada en la interacción con RecA: papel de RecU en etapas tempranas de la recombinación homóloga

Se desconoce cómo se conectan los procesos de intercambio de cadenas y la resolución de las HJs. Mediante estudios *in vitro* se ha visto que la resolvasa RecU, presente en todos los Firmicutes, estimula el cargado de RecA sobre el ADNcs y estimula la formación del bucle-D llevada a cabo por RecA. Además, inhibe la hidrólisis de rATP o dATP y la reacción de intercambio de cadenas mediada por RecA (Carrasco *et al.* 2005). Por otro lado, RecU es capaz de llevar a cabo el anillamiento entre un ADNcs circular y el duplex de ADN homólogo con un extremo 3' de cadena sencilla (Ayora *et al.* 2004), lo que sugiere que esta resolvasa puede tener también un papel en etapas tempranas de la recombinación.

Para entender cómo funcionan los mecanismos que comunican las etapas tempranas y tardías de la recombinación homóloga en Firmicutes y para determinar la posible relevancia de la interacción con RecA *in vivo*, lo que se hizo fue buscar mutantes de *recU* que tuvieran una correcta segregación cromosomal, pero que estuvieran afectados en transformación plasmídica. Así se demostraría que las actividades observadas *in vitro* tienen una correlación directa con la fisiología.

3.1. Aislamiento de mutantes de *recU* afectados en las etapas tempranas de la recombinación

Se construyeron mutantes de *recU* mediante mutagénesis dirigida en residuos conservados en las proteínas RecU de Firmicutes. Se seleccionaron mutantes en función de su fenotipo, es decir, que presentaran una segregación cromosomal correcta pero que estuvieran afectados en transformación plasmídica. Se encontraron varios, pero en una primera etapa se analizaron dos, *recU56* (residuo K56 cambiado por una alanina) y *recU71* (residuo R71 cambiado por una alanina), que se usaron para estudios posteriores.

Lo primero que se estudió fue la eficiencia de recombinación de las cepas mutantes. Para ello se analizó tanto la transformación cromosomal (recombinación intermolecular) como la transformación plasmídica (intramolecular) (tabla 8). En la cepa $\Delta recU$ la eficiencia de recombinación plasmídica disminuye hasta 30 veces en comparación con la cepa *rec*⁺. En el caso de los mutantes *recU56* y *recU71* se reduce 10 y 50 veces.

Si durante la transformación plasmídica RecU sólo interviniese en las etapas tardías, la cepa $\Delta recU$ debería tener un fenotipo similar al de la cepa $\Delta ruvAB$ en transformación plasmídica. Sin embargo, la frecuencia de transformación disminuye menos de 3 veces en $\Delta ruvAB$ respecto a la cepa *rec*⁺. Una hipótesis es que la presencia de RecA, que no está implicada en transformación plasmídica *per se*, podría llevar a la acumulación de intermedios tóxicos al polimerizar sobre el ADNcs en los mutantes de *recU*. RecU podría modular esta acción de RecA durante el proceso de transformación (Carrasco *et al.* 2005) Si la hipótesis es correcta, en

ausencia de RecA, no se requeriría la actividad de RecU. Se mostró que la ausencia de RecA o de RecA y RecU bloquea la transformación cromosomal (Alonso *et al.* 1991), pero se ha visto que en ausencia de RecA se elimina casi totalmente el requerimiento de RecU durante la transformación plasmídica (tabla 8). Probablemente en ausencia de RecU, el filamento nucleoproteico de RecA abre una vía improductiva para el proceso de recombinación plasmídica. Los mismos resultados se obtuvieron con los dobles mutantes $\Delta recA recU56$ y $\Delta recA recU71$, lo que sugiere que sólo están afectados en la interacción con RecA.

Genotipo	Eficiencia de transformación plasmídica	Eficiencia de transformación cromosomal
rec^+	1	1
$\Delta recU^a$	0,03	0,40
$recU56$	0,17	0,43
$recU71$	0,02	0,36
$\Delta ruvAB$	0,30	0,81
$\Delta recA^a$	0,96	<0,0001
$\Delta recA recU56$	0,59	<0,0001
$\Delta recA recU71$	0,40	<0,0001
$\Delta recA \Delta recU$	0,42	<0,0001

Tabla 8. Medida de la eficiencia de transformación plasmídica y cromosomal en cepas de *B. subtilis*. El rendimiento de transformación cromosomal (transformantes *met*⁺) y de transformación plasmídica de pUB110 (transformantes resistentes a kanamicina) se corrigió en función de la captación de ADN y viabilidad y se normalizó respecto a la cepa *rec*⁺, que se toma como 1. Los resultados son la media de al menos 5 experimentos independientes. ^aLos valores de frecuencia de transformación de $\Delta recA$ y $\Delta recU$ están ya descritos y se han añadido como comparación.

3.2. Mutaciones en los residuos K56 y R71 de la región del tallo dan lugar a un defecto en reparación por recombinación homóloga

Como se ha comentado anteriormente, en células WT en fase exponencial de crecimiento, el número de células anucleadas es muy bajo (0.05% del total). En cambio, la frecuencia de anucleadas, o acumulación de dímero u oligómeros de cromosomas, aumenta más de 80 veces en las cepas $\Delta recU$. Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con las dos cepas mutantes para analizar la capacidad de reparación del ADN tras una exposición a daño y la segregación cromosomal (Fig. 20). En las cepas $recU56$ y $recU71$ en crecimiento exponencial, la frecuencia de células anucleadas no parece estar afectada (0.09% del total; n= 846 y 738 respectivamente). Esto sugiere que a diferencia de lo que ocurre en las cepas $\Delta ruvAB$ o $\Delta recU$, en $recU56$ y $recU71$, las HJs se resuelven en productos independientes (Fig. 20a), con lo que no hay problema en segregación cromosomal.

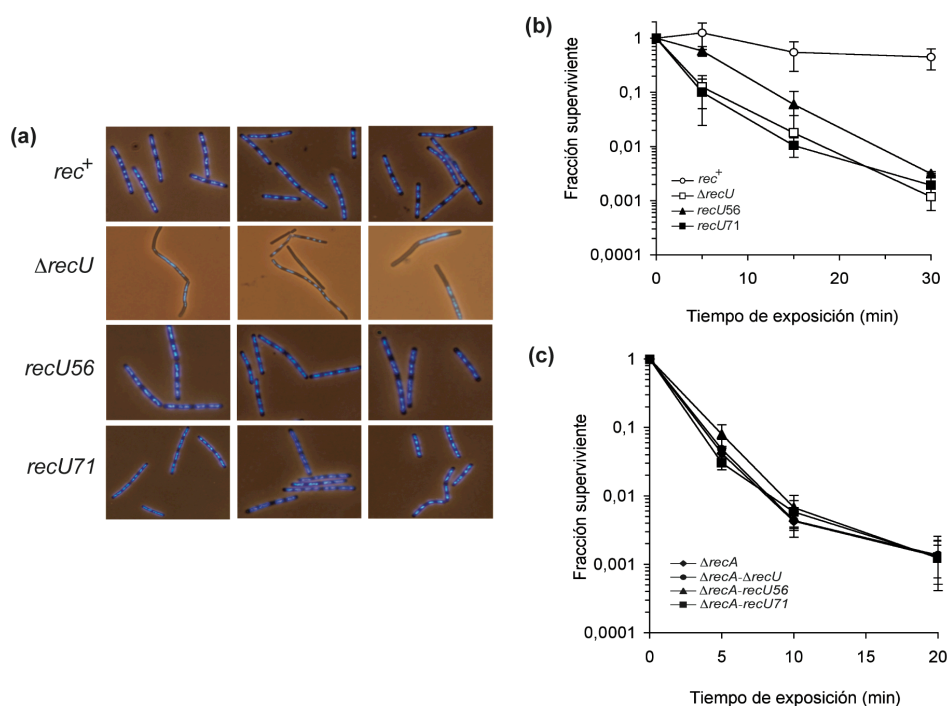


Figura 20. Segregación cromosomal y defecto en la reparación de ADN de Δ *recU*, *recU56* y *recU71*. (a) Se fijaron células *rec*⁺, *recU56* y *recU71*, crecidas en LB hasta la fase exponencial y se tiñeron los nucleoides con DAPI para analizarlos por microscopía de fluorescencia. (b) Viabilidad de las cepas en fase exponencial de crecimiento tras la exposición a 10 mM de MMS. (c) Viabilidad de los dobles mutantes *recA recU*.

A continuación se analizó la función de reparación por recombinación de los mutantes *recU56* y *recU71*. El mutante *recU56* es sensible a MMS y la cepa Δ *recU* y *recU71* son muy sensibles (Fig. 20b). Para determinar si la reparación del ADN es independiente de RecA en los mutantes *recU56* y *recU71*, se construyeron los dobles mutantes y se midió la viabilidad en presencia de MMS. La inactivación de *recA* en una cepa Δ *recU* da lugar a una sensibilidad extrema a MMS (Fig. 20c). Estos resultados indican que la RH en los mutantes de *recU* es vía RecA, ya que los dobles mutantes son tan sensibles a MMS como la cepa Δ *recA* y se descarta la hipótesis de que se abra una nueva vía de recombinación.

3.3. RecUK56A y RecUR71A unen y cortan estructuras de Holliday

Se sobreexpresaron y purificaron las proteínas mutantes RecUK56A y RecUR71A. Mediante estudios de dicróismo circular se confirmó que la proporción de hélices α y de hojas β de RecU y de las proteínas mutantes es similar. Por otro lado, mediante ensayos de oligomerización mediante conjugación química con DSS,

Resultados

se determinó que las proteínas mutantes son capaces de formar dímeros. Todo esto indica que la organización estructural de las proteínas mutantes no parece haberse visto afectada.

En cuanto a la capacidad de unión a HJ, RecUK56A tiene una afinidad similar a la de RecU WT ($K_{app} = 0,8$ nM), mientras que RecUR71A tiene una afinidad 1,5 veces más baja ($K_{app} = 1,2$ nM) (Fig. 21a).

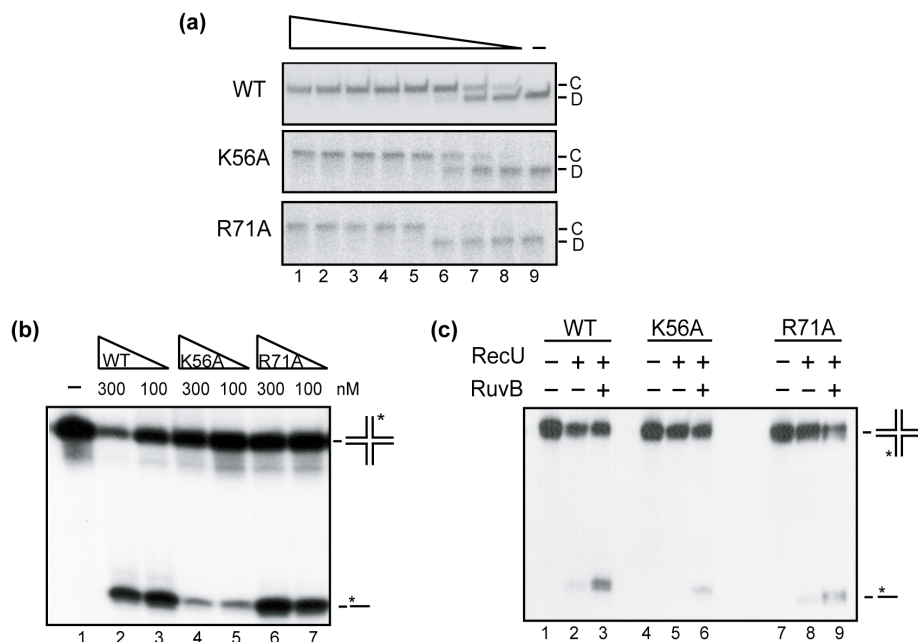


Figura 21. Unión y resolución de HJs e interacción con RuvB de los mutantes RecUK56A y RecUR71A (a) Reacción de unión a HJs. La estructura sintética HJ3 (0,1 μM en mol de nt) que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5' se incubó con cantidades crecientes de las proteínas RecU, RecUK56A y RecUR71A (de 0,25 a 36 nM) en tampón A que contiene 1 mM de MgCl₂. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. D: ADN libre; C: complejo HJ- proteína. (b) Reacción de corte de HJs. Se incubaron las variantes de RecU (100 y 300 nM) junto con la HJ3 (0,1 μM) que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado, durante 30 min a 37°C en tampón C que contiene 10 mM de MgCl₂. Las muestras se analizaron mediante dPAGE al 15 % y se reveló por autorradiografía. (c) Reacción de corte de las variantes de RecU (100 nM) en presencia de RuvB (40 nM) y 1 mM ATPγS. En este caso la estructura HJ3 contiene el oligonucleótido JO.2 marcado radiactivamente. - y + indican ausencia o presencia de proteína. La concentración de RecU se expresa en moles de dímero y la de RuvB en moles de hexámero.

Se llevaron a cabo ensayos de resolución de HJs con los mutantes. Ambos mutantes cortan HJs dando lugar a un producto con una movilidad similar al que produce RecU WT (Fig. 21b), lo que indica que el producto de corte se produce en la secuencia consenso.

Como en el caso de la proteína RecU WT, se comprobó que los mutantes RecUK56A y RecUR1A son capaces de interactuar con RuvB y por tanto RuvB es

capaz de estimular la actividad de corte de estos mutantes (Fig. 21c). Estos resultados indican que la acción sobre las HJs de los mutantes no se ha visto prácticamente afectada, lo que coincide con los resultados *in vivo* (Fig. 20), y que la actividad de RecU sobre HJs y sobre RecA se pueden separar genéticamente. Los mutantes RecUK56A y RecUR71A no presentan un defecto en segregación, pero están afectados en transformación plasmídica.

3.4. La región del tallo está implicada en la interacción con RecA

Se ha visto que RecU es capaz de modular algunas actividades de RecA (Carrasco *et al.* 2005). Por un lado estimula la unión de RecA al ADNcs, por lo que estaría favoreciendo el cargado de RecA en el ADN y la formación del D-loop. Por otro lado inhibe la actividad dATPasa dependiente de ADNcs y la reacción de intercambio de cadenas, por lo que estaría inhibiendo un avance extensivo del intercambio de cadenas, redirigiendo entonces el intermediario formado hacia su resolución.

3.4.1. RecUK56A y RecUR71A no inhiben la actividad dATPasa dependiente de ADNcs de RecA

Como se ha mencionado anteriormente, independientemente del orden de adición, RecU inhibe parcialmente la hidrólisis de dATP o rATP llevada a cabo por RecA (Carrasco *et al.* 2005). Se comprobó la capacidad de los mutantes de inhibir la actividad de RecA, usando un exceso de ADNcs.

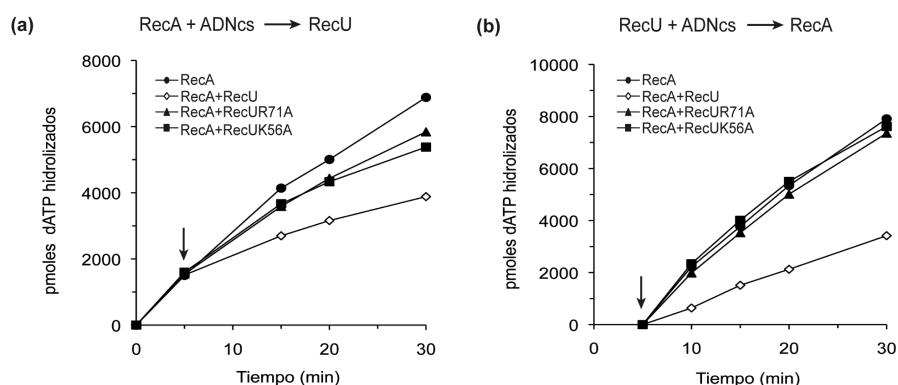


Figura 22. Efecto de RecUK56A o R71A en la actividad de hidrólisis de dATP catalizada por RecA. (a) Se preincubó ADNcs (10 μ M) con RecA (1,3 μ M) en tampón D que contiene 10mM MgOAc₂, en presencia de 2 mM de dATP durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU o las variantes de RecU (200 nM). La reacción se incubó 25 min más a 37°C y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. La hidrólisis de dATP se expresa en pmoles. (b) Reacción inversa en la que se preincubó el ADNcs con RecU o las variantes de RecU y luego se añadió RecA. La flecha indica el momento de adición de la segunda proteína.

Resultados

Los mutantes RecUK56A y RecUR71A son incapaces de ejercer este efecto negativo sobre la actividad de RecA (Fig. 22a). Se obtiene el mismo resultado cuando se añade RecA al complejo preformado de RecU con el ADNcs (Fig. 22b). En el segundo caso, es decir, cuando se añade primero RecU y luego RecA, la inhibición por parte de RecU es mayor, mientras que los mutantes no afectan la actividad de hidrólisis. Esto podría ser debido a que la inhibición causada por RecU sea porque secuestra al ADNcs y que los mutantes no se unan al ADNcs, pero el ensayo se lleva a cabo con un exceso de ADNcs.

RecU se une al ADNcs y cataliza la renaturalización de dos ADNcs homólogos (Ayora *et al.* 2004). Para comprobar que en los mutantes no se había afectado la capacidad de unir ADNcs se realizó un ensayo de renaturalización de ADN (Fig. 23). Se comprobó que los mutantes unen y anillan ADNcs complementarios con una eficiencia similar a la proteína WT, por lo que se descartó esta hipótesis.

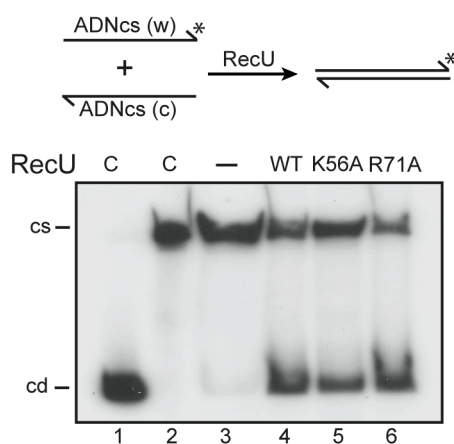


Figura 23. Actividad de anillamiento de ADNcs de **RecUK56A** y **RecUR71A**. Se incubaron las distintas variantes de RecU (200nM) con ADNcd de 420 pb marcado y desnaturalizado por calor, durante 15 min a 37 °C. Posteriormente se desproteinizaron las muestras, se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. C: controles de migración de ADN de cadena sencilla (cs) y de cadena doble (cd). - indica ausencia de proteína.

3.4.2. RecU K56A y RecUR71A no inhiben la actividad de intercambio de cadenas dependiente de dATP de RecA

El complejo (d/r)ATP-RecA-ssDNA es la forma activa de RecA. La formación de este complejo se divide en dos etapas: nucleación y filamentación. En la nucleación de 4 a 6 monómeros de RecA se unen a ADNhs. A ésta le sigue el proceso dinámico de filamentación. Si RecU inhibiese el proceso de nucleación debería estar inhibido el proceso de recombinación, pero si se afecta a la filamentación se deberían acumular intermedios de recombinación. RecA lleva a cabo la reacción de recombinación entre un ADNcs y un ADNcd lineal homólogo, dando lugar como producto final ADN circular mellado (cm) (Fig. 24^a) (Carrasco *et al.* 2005; Manfredi *et al.* 2008). RecU inhibe la acumulación del producto final, detectándose la

acumulación del producto intermedio de la reacción, que corresponde a las moléculas anilladas (Fig. 24b, calle5) . Por el contrario, los mutantes no son capaces de inhibir a RecA (Fig. 24a, calles 6 y 7). Se obtuvieron resultados similares cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de ADNcs y ADNcd lineal homólogo con un extremo de cadena sencilla (Fig. 24b, calles 6 y 7).

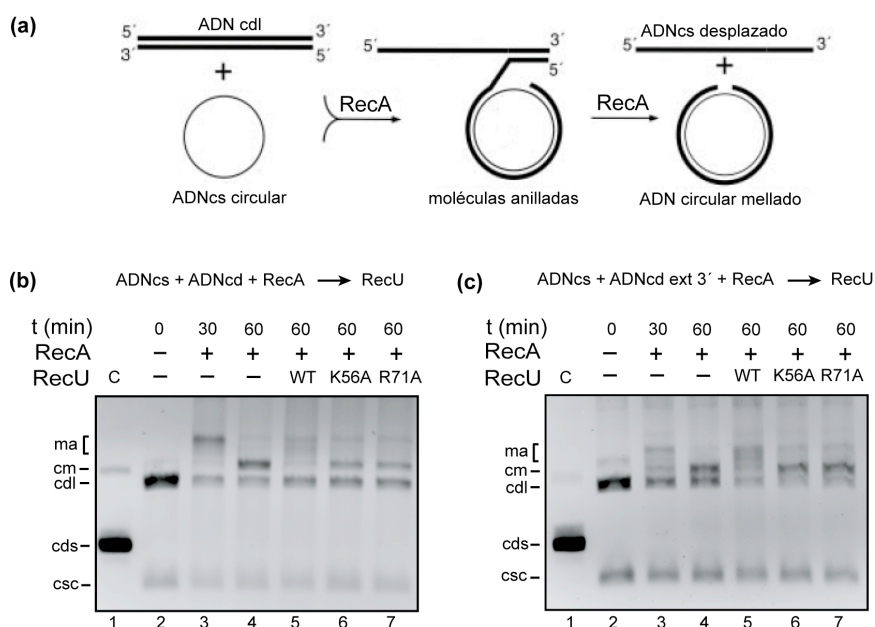


Figura 24. Efecto de RecUK56A y RecUR71A en la actividad de intercambio de cadenas de RecA.

(a) Esquema de la reacción de intercambio de cadenas, donde se muestra el producto intermedio de la reacción, las moléculas anilladas (ma) y el producto final, círculo mellado (cm). (b) Se preincubó ADNcs (10 μ M en moles de nt) y ADNcd lineal homólogo (20 μ M) con RecA (1,3 μ M en moles de monómero) en presencia de 10 mM de MgOAc₂ y 2 mM de dATP durante 30 min a 37 °C. En ese momento se añadió RecU o sus variantes (200 nM en moles de dímero) y la reacción se incubó 30 min más a 37 °C. Después de desproteinizar, las muestras se analizaron en un gel de agarosa del 0,8 %. (b) Se realizó el mismo experimento con ADNcs y ADNds homólogo con un extremo 3' libre. C: control de migración de ADNcd superenrollado (csc); cds: ADNcs circular; cdl: ADNcd lineal; cm: ADN circular mellado; ma: moléculas anilladas; - y + indican ausencia o presencia de proteína.

3.4.3. RecUK56A y RecUR71A no interaccionan con RecA

Todos los resultados anteriores sugieren que RecU interacciona con RecA y que RecUK56A y RecUR71A no lo hacen. Se realizaron ensayos de interacción en presencia de DSS para comprobar si las proteínas RecU WT y las proteínas mutantes RecUK56A y RecUR71A interaccionaban directamente con RecA (Fig. 25). Cuando RecA se incubaba en presencia de DSS se observan unas bandas minoritarias, además de la del monómero de 38 kDa (que migra a la altura del marcador de 47 kDa), que corresponderían a distintos estados oligoméricos de la proteína, como son 76 (A₂), 116 (A₃) y >160 kDa (A_n) (Fig. 25a, calle 4). El monómero de RecU de 24 kDa migra

Resultados

en el gel a la altura del marcador de 25 kDa (Fig. 25b, calle 1). En presencia de DSS se detecta el estado dimérico de la proteína, U₂ (48 kDa) (Fig. 25b, calle 3).

Cuando se incubaba RecA con RecU y DSS, se observa una nueva banda de unos 62kDa, que reacciona con anticuerpos policlonales anti-RecA (Fig. 25a, calle 5) o anti-RecU (Fig. 25b, calle 5). Esta nueva banda proteica fue tratada mediante proteólisis parcial. En el análisis posterior por MALDI-TOF se detectaron polipéptidos de ambas proteínas. Por lo tanto, la banda proteica de 62 kDa, podría estar compuesta por un monómero de RecU (24 kDa) y un monómero de RecA (38 kDa), entrecruzados por el DSS. RecU y RecA interaccionan aun en ausencia de dATP y/o ADNcs. Cuando se incuban cada uno de los mutantes, RecUK56A y RecUR71A con RecA, la banda de interacción de 62 kDa no se detecta con ninguno de los anticuerpos (Fig. 25a y b, calle 8 y 11).

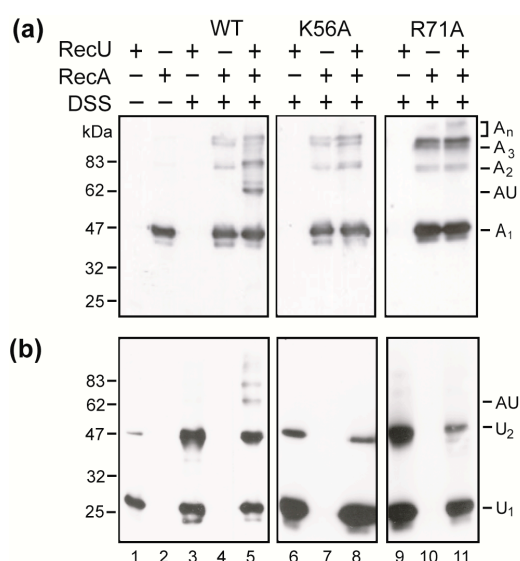


Figura 25. Análisis de la interacción de los mutantes RecUK56A y RecUR71A con RecA. Las distintas variantes de RecU (2 μ M en moles de monómero) se incubaron con RecA (2 μ M en moles de monómero) en tampón A que contiene 1 mM MgCl₂ con 50 mM NaCl, durante 10 min a 4°C. Se añadió DSS a 125 μ M y se incubó la reacción durante 10 min más a 37 °C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante western blot usando anticuerpos anti-RecA **(a)** o anti-RecU **(b)**. + y - indican respectivamente presencia y ausencia de proteína o DSS; U_n y A_n indican los distintos estados oligoméricos de RecU y RecA (monómero, dímero, etc); AU: complejo RecA - RecU.

Estos resultados indican que RecU tiene principalmente dos funciones *in vivo*, la de catalización de la resolución de HJs y la de modulación de la actividad de RecA. Estas dos funciones se pueden separar genéticamente, ya que mutaciones en los residuos K56 y R71 dan lugar a proteínas que aunque son capaces de resolver HJs, no incapaces de inhibir la actividad dATPasa ni de intercambio de cadenas llevadas a cabo por RecA. Además, la sensibilidad a MMS que presentan estas cepas mutantes sugieren que la actividad de modulación de RecA juega un importante papel en la viabilidad de la célula.

4. Papel de la región del tallo en el reconocimiento y distorsión de las estructuras de Holliday

4.1. Mutaciones en los residuos Y80 y F81 dan lugar a un fenotipo complejo

En presencia de Mg^{2+} , las estructuras de Holliday adoptan una conformación apilada tipo “x” (Duckett *et al.* 1988; Lilley and Clegg 1993). Para llevar a cabo la resolución, las resolvasas, incluida RecU, una vez que reconocen y se unen a las HJs, tienen que producir una distorsión de las mismas para llevarlas hacia la forma abierta tipo “+”. En colaboración con el Dr. John Rafferty de la universidad de Sheffield se diseñó un modelo de interacción entre RecU y la HJ (Fig. 26). En ese modelo, la zona del tallo penetraría en el punto de entrecruzamiento facilitando de ese modo la formación de la estructura abierta. Si el modelo propuesto es correcto, la región del tallo tendría un papel clave en el reconocimiento y unión al ADN, ya que residuos localizados en esa región podrían interaccionar directamente con el ADN, particularmente residuos aromáticos podrían tener un papel clave en el reconocimiento de la estructura. Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de mutagénesis dirigida de los residuos aromáticos conservados Y80 y F81, que podrían estar directamente implicados en la interacción con el esqueleto de fosfato.

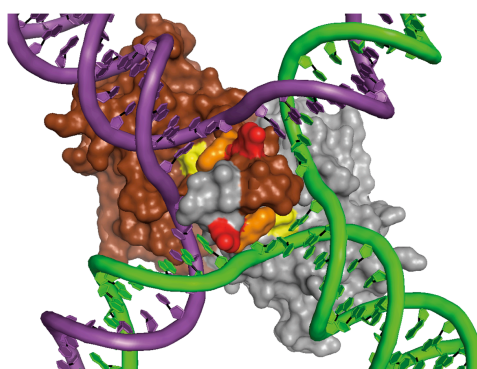


Figura 26. Localización de los residuos Y80 y F81 en el modelo de interacción del dímero de RecU con la estructura de Holliday. En la reconstrucción, realizada con el programa Pymol, se muestra un monómero en color marrón y el otro en gris. Los residuos del centro catalítico se muestran en amarillo y los residuos Y80 y F81 se muestran en rojo y naranja respectivamente. Los residuos K56 y R71A quedarían ocluidos.

Una vez construídas las cepas mutantes *recU80* (donde el residuo tirosina 80 se substituyó por alanina) y *recU81* (donde el residuo fenilalanina 81 se substituyó por alanina), se analizó la capacidad de segregación de cromosomas mediante la tinción de nucleoides con DAPI (Fig. 27a).

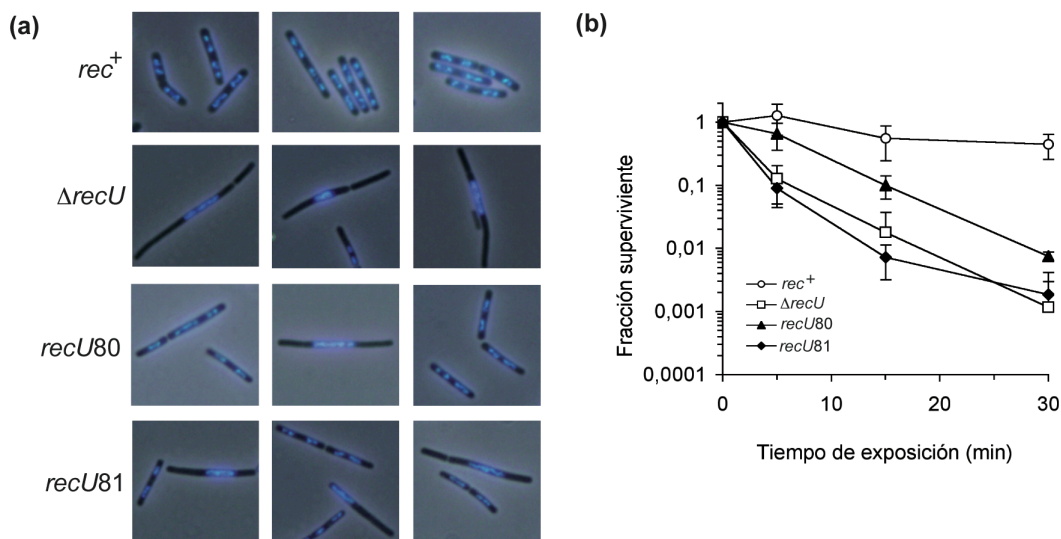


Figura 27. Defecto en segregación y viabilidad de los mutantes *recU80* y *recU81*. (a) Se fijaron células *rec*⁺, *recU80* y *recU81*, crecidas en LB hasta la fase exponencial y se tiñeron los nucleoides con DAPI para analizarlos por microscopía de fluorescencia. (b) Viabilidad de las cepas en fase exponencial tras la exposición a 10 mM de MMS.

Si los residuos mutados están implicados en el reconocimiento y unión a HJs o en resolución, es de esperar que las cepas mutantes tengan un defecto severo en segregación cromosomal, debido a la acumulación de HJs no procesadas. Al igual que la cepa Δ *recU*, la cepa *recU81* presenta un alto porcentaje de células anucleadas (~6%, n= 876 cels.), lo que está indicando que la proteína RecU81A probablemente está afectada en resolución de HJs. En cambio, en la cepa *recU80* este porcentaje disminuye (1,5 %, n= 1300 cels), pero es 30 veces superior al de la cepa salvaje (0,05%), lo que indica que la proteína RecU80A conserva parte de la actividad *in vivo* (Fig. 27a).

Para confirmar que la proteína RecU80A retenía parte de la actividad *in vivo*, se hicieron ensayos de sensibilidad a MMS (Fig. 27b). La cepa *recU80* es moderadamente sensible a una exposición a MMS, comparado con la sensibilidad de la cepa Δ *recU*, cuya viabilidad cae de 10^3 a 10^4 veces respecto a la cepa *rec*⁺. En cambio, la cepa *recU81* muestra una sensibilidad similar a la cepa Δ *recU*, lo que indica que la función de RecU está totalmente afectada por esta mutación. El modelo de la figura 26 predice que la interacción con RecA también debería estar afectada. En la cepa Δ *recU* la eficiencia de recombinación plasmídica disminuye hasta 30 veces en comparación con la cepa *rec*⁺ (Tabla 8). En el caso de los mutantes *recU80* y *recU81* se reduce 10 y 70 veces, respectivamente. Como se ha descrito anteriormente la ausencia de RecA suprime el defecto de la cepa *recU81* en transformación plasmídica.

4.2. El tallo determina la especificidad de unión de RecU a las HJs y es esencial para la distorsión y resolución

Para determinar qué defecto en la actividad de RecU presentaban las variantes mutadas, se llevó a cabo la purificación de las proteínas RecUY80A y RecUF81A, para su posterior análisis bioquímico. Mediante dicroísmo circular se confirmó que la estructura secundaria de ambas proteínas no se había visto alterada y mediante ensayos de entrecruzamiento con DSS, se confirmó que ambos mutantes son capaces de formar dímeros estables, incluso a altas concentraciones de NaCl (Fig. 28)

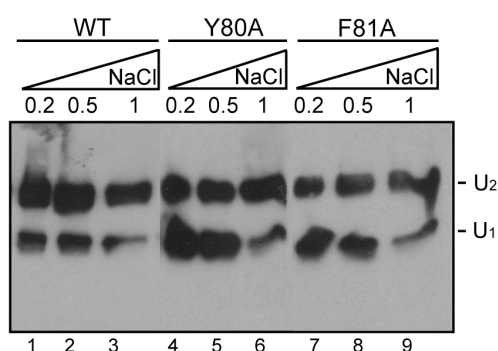


Figura 28. Ensayo de dimerización de los mutantes RecUY80A y RecUF81A. Las distintas variantes de RecU (0,1 μ M en moles de dímero) se incubaron en tampón A que contiene 1 mM $MgCl_2$ con concentraciones crecientes de NaCl (de 0,2 a 1 M), durante 10 min a 4°C. Se añadió DSS a 125 μ M y se incubó la reacción durante 10 min más a 37 °C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante western blot usando anticuerpos anti-RecU. + y - indican respectivamente presencia y ausencia de proteína o DSS; U₁ y U₂: monómero y dímero de RecU respectivamente.

Con el objeto de determinar si los mutantes implicados en reconocimiento y procesamiento de la HJ se llevaron a cabo ensayos de unión, distorsión y resolución de HJ, que se detallan a continuación.

4.2.1. Especificidad de unión y estabilidad del complejo ADN-proteína

Lo primero que se analizó fue la afinidad de unión de los mutantes a HJs mediante ensayos de retardo en gel. En presencia de 1 mM de $MgCl_2$, RecU WT (K_{app} = 0,8 nM), une específicamente HJ con 200 a 500 veces más afinidad que a ADNcs de 80nt (K_{app} ~ 200 nM) (Ayora *et al.* 2004). Ambos mutantes, RecUY80A y RecUF81A, muestran una muy baja afinidad de unión (K_{app} = 50 nM y 100 nM respectivamente) (Fig. 29a). En cambio, la afinidad de unión a ADNcs no ha variado más de 2 veces respecto a RecU WT (K_{app} = 350 y 400 nM para RecUY80A y RecUF81A respectivamente) (Fig. 29b). Esto parece indicar que los mutantes han perdido la especificidad de unión a HJs o los complejos son más inestables, pero la unión inespecífica a ADNcs no parece estar afectada.

Resultados

Se midió además la estabilidad del complejo ADN-proteína, mediante ensayos a filtros de nitrocelulosa. Debido a la baja afinidad de unión de las proteínas mutantes a las HJ en presencia de Mg^{2+} , donde éstas adoptan una conformación apilada tipo “x”, los ensayos de estabilidad se hicieron en presencia de 1 mM EDTA. En estas condiciones las HJs adoptan una conformación abierta y se vio que los mutantes unían HJs con mayor eficiencia en estas condiciones. La K_{app} de RecUY80A y RecUF81A disminuía hasta 35 y 15 nM respectivamente (Fig. 29b). Los ensayos de estabilidad mostraron que RecUF81A forma complejos con la HJ menos estables (vida media de 10 min) que RecU WT (vida media > 16 min) (Fig. 29b). En cambio la estabilidad de los complejos ADN-proteína en RecUY80A no parece haberse visto alterada.

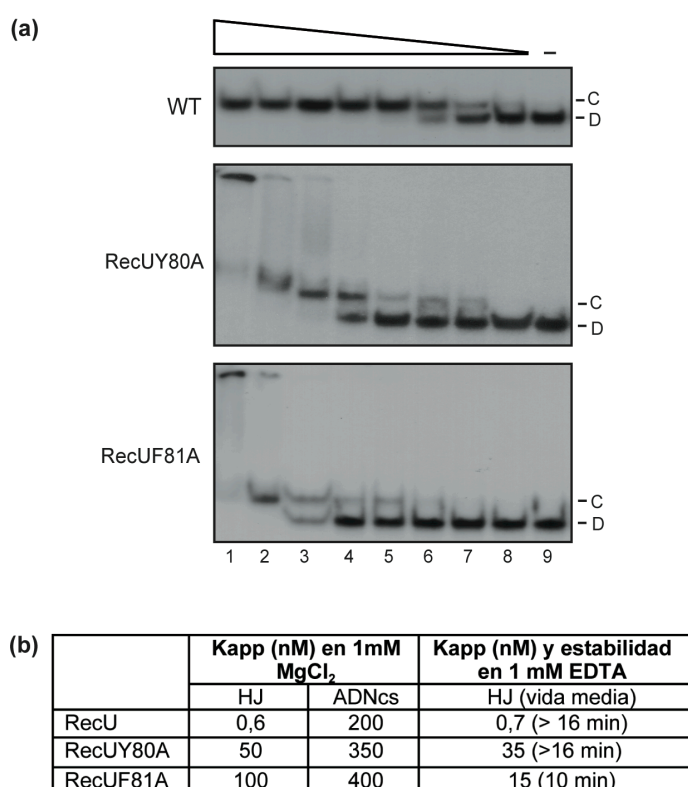


Figura 29. Unión a HJs y estabilidad del complejo ADN-proteína en los mutantes RecUY80A y RecUF81A. (a) Se incubaron concentraciones crecientes de RecU (0,25 a 32 nM), RecUY80A (3 a 400 nM) y RecUF81A (3 a 400 nM) junto con la HJ3 que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5' durante 15 min a 37°C en tampón A que contiene 1 mM de MgCl₂ con 50 mM NaCl. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. K_{app}: constante aparente de unión. D: ADN libre; C: complejo proteína-HJ. (b) Valores de K_{app} (en nM) para los distintos sustratos y vida media (en min) de los complejos ADN-proteína. Las concentraciones de RecU y las variantes se expresan en moles de dímero. Los valores son la media de cuatro experimentos.

Por lo que estos resultados indican que en los mutantes RecUY80A y RecUF81A se ha visto afectada la especificidad de unión por las HJs, y además RecUF81A forma complejos inestables con dichas estructuras.

4.2.2. Resolución de estructuras de Holliday e interacción con RuvB

A continuación se analizó la capacidad de los mutantes de procesar HJ *in vitro*. Debido a que, como se ha visto en el apartado anterior, en los mutantes RecUY80A y RecUF81A se ha visto que tienen una afinidad de unión a HJ muy baja, es de esperar que la eficiencia de corte también sea reducida o que se necesite mayor concentración de proteína para producir el corte. Para confirmarlo se llevaron a cabo ensayos de corte de la estructura HJ3 en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y análisis en geles desnaturizantes de poliácridamida (Fig. 30).

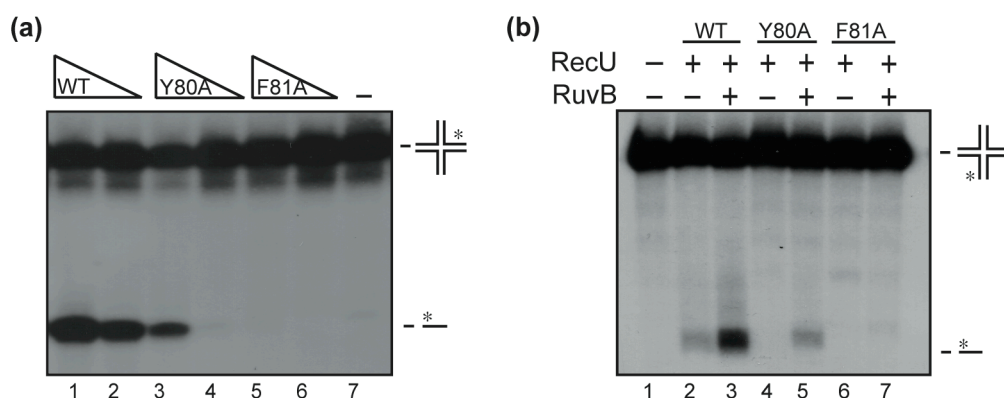


Figura 30. Resolución de HJs de los mutantes RecUY80A y RecUF81A e interacción con RuvB. (a) Reacción de corte de HJ. Se incubaron las variantes de RecU (100 y 300 nM) junto con la HJ, que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado, durante 30 min a 37 °C en tampón C que contiene 10 mM de $MgCl_2$. Las muestras se analizaron mediante dPAGE y se reveló por autorradiografía. **(b)** Reacción de corte de las variantes de RecU (100 nM) o las variantes de RecU (300 nM) en presencia de RuvB (40 nM) y 1 mM $ATP\gamma S$. En este caso la estructura HJ3 contiene el oligo JO 3.2 marcado. – y + indican ausencia o presencia de proteína. Las concentraciones de RecU se expresan en moles de dímero y las de RuvB en moles de hexámero.

El mutante RecUY80A, que estaba parcialmente afectado *in vivo*, es capaz de resolver la estructura, aunque sólo a altas concentraciones (>300 nM, calle 3) dando lugar al mismo producto de corte que la proteína RecU WT. Esto quiere decir que el corte se produce en la secuencia consenso que reconoce RecU. Por otro lado, en el mutante RecUF81A, que estaba muy afectado *in vivo*, la actividad de corte está totalmente anulada (Fig. 30a, calles 5 y 6). Se realizó el ensayo a altas concentraciones de proteína (1 μM) y se obtuvo el mismo resultado. Se llevó a cabo

Resultados

la reacción de resolución de la estructura HJ3 en presencia de RuvB (Fig. 30b) y se observó que, aunque la actividad de corte en los mutantes es apenas detectable, RuvB es capaz de estimular la reacción de corte de los mutantes (Fig. 30b, calles 5 y 7). Este resultado sugería que la capacidad de interacción con RuvB en los mutantes no se había visto afectada. Para comprobarlo, se realizó un ensayo de entrecruzamiento de las proteínas en presencia de DSS (Fig. 31). Al igual que RecU WT, cuando se incuban los mutantes RecU80A y RecUF81A junto con RuvB en presencia de DSS, se detecta la banda de 62 kDa, que correspondería con el complejo RuvB-RecU.

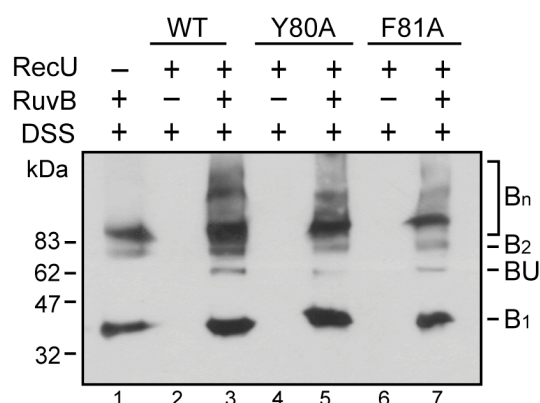


Figura 31. Análisis de la interacción de los mutantes RecUY80A, RecUF81A con RuvB. Las distintas variantes de RecU (0,8 μ M en moles de monómero) se incubaron con RuvB (0,6 μ M en moles de monómero) en tampón I que contiene 10 mM MgOAc₂ con 90 mM NaCl y 2 mM ATP, durante 10 min a 4 °C. Se añadió DSS a 125 μ M y se incubó la reacción durante 10 min más a 37 °C. Las muestras analizaron en SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante western blot usando anticuerpos anti-His (anti-RuvB). - y + indican respectivamente ausencia o presencia de proteína. B₁, B₂, B_n indican los distintos estados oligoméricos de RuvB (monómero, dímero, etc); BU: complejo RecU - RuvB.

4.2.3. Distorsión de estructuras de Holliday

Según el modelo de unión de RecU a las HJ (McGregor *et al.* 2005), la inserción de la región del tallo en el centro de la estructura daría lugar a la apertura de la misma adoptando finalmente una conformación plana de simetría 4 (ver Fig. 26). Esta distorsión sería esencial para que la resolución se produzca de forma correcta. Para explicar la inactividad del mutante RecUF81A y para comprobar si los residuos Y80 y F81 intervienen directamente en la interacción con las bases del ADN, se llevaron a cabo ensayos de distorsión. En este ensayo se utilizaron 6 sustratos que contienen dos brazos cortos y dos largos, generados por digestión de la estructura HJ3 con enzimas de restricción (Fig. 32).

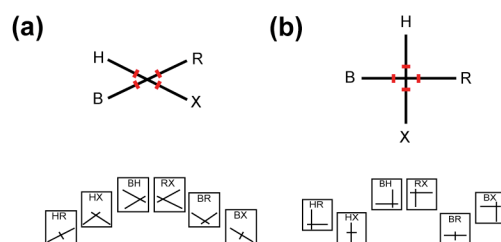


Figura 32. Estructuras de Holliday digeridas y patrón de migración en presencia de $MgCl_2$ y EDTA. La presencia de un corte único en cada uno de los brazos de la estructura HJ3 le da el nombre (*Bam*HI, B; *Hind*III, H; *Eco*RI, R y *Xba*I, X), mostrado con un segmento de color rojo. La estructura de Holliday se cortó con dos enzimas para generar seis especies con dos ramas cortas y dos ramas largas. Se muestra la estructura y migración en un gel ndPAGE de las seis especies en presencia de $200\ \mu M$ $MgCl_2$ (a) y $1\ mM$ EDTA (b). El nombre de cada una de las especies viene dado por las dos ramas que quedan intactas.

La estructura HJ3 contiene en cada uno de los brazos un sitio de restricción para una enzima (*Bam*HI: B, *Eco*RI: R, *Hind*III: H, *Xba*I: X) a $12\ pb$ del punto de entrecruzamiento. Cada especie se genera mediante digestión doble y el nombre viene dado por las dos ramas largas que quedan. La movilidad en un gel de electroforesis depende del ángulo formado entre los dos brazos.

Todas las proteínas de unión a HJs estudiadas producen una modificación en la conformación de la estructura (Duckett *et al.* 1995; Chan *et al.* 1998), incluida RecU. El patrón de migración de bandas refleja la forma en que la proteína se une a la superficie. Cuando se realiza el ensayo de unión de RecU a las 6 especies generadas por digestión, en presencia de $MgCl_2$ o EDTA una vez que se une RecU la migración de las 6 especies sigue un patrón lento-rápido-lento-lento-rápido-lento (Fig. 33a, calles 7 al 12). Este patrón de migración es el que presentan las 6 especies en presencia de EDTA sin proteína (Fig. 33b, calles 1 al 6) y corresponde a la forma abierta de la HJ.

A la concentración de proteína probada, RecUY80A no es capaz de distorsionar la HJ en presencia de $10\ mM$ $MgCl_2$, que es la concentración óptima para el corte de la estructura (Fig. 33a, calles 13 al 18). El mutante RecUF81A muestra dos patrones de movilidad (Fig. 33a, calles 19 al 24). Se desconoce la naturaleza de estos dos tipos de complejos, pero parece no corresponder con un complejo de monómeros y dímeros de RecUF81A con el ADN, porque como se ha mostrado anteriormente, este mutante es capaz de formar dímeros estables (ver Fig. 28).

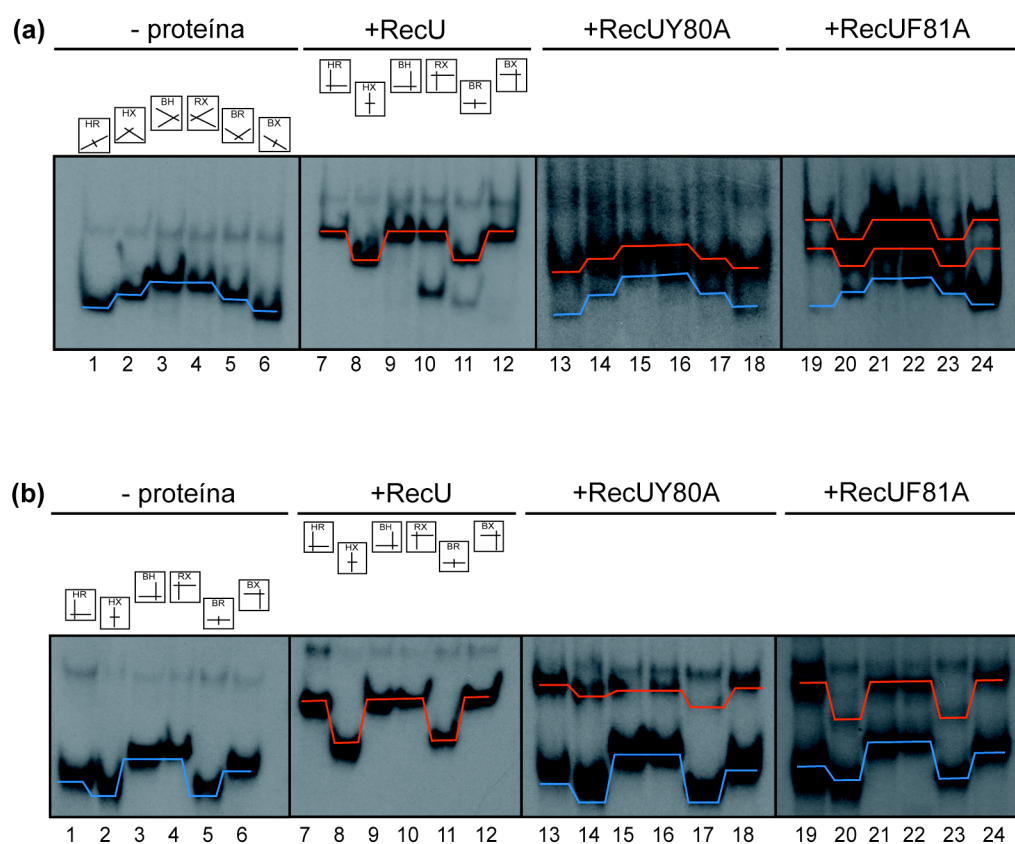


Figura 33. Conformación de la estructura de Holliday unida a RecU y a las variantes RecUY80 y RecUF81A. Las seis especies generadas por cortes de la estructura HJ3 se incubaron con 3 nM de RecU y 75 nM de las proteínas mutadas durante 15 min a 37°C en tampón A (que contiene 1 mM MgCl₂) en el caso de RecU y tampón C (que contiene 10 mM MgCl₂) en el caso de las variantes RecUY80A y RecUF81A **(a)** o 1 mM EDTA **(b)**. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 8 % en presencia de 200 µM MgCl₂ o 1 mM EDTA y se reveló por autorradiografía. La línea azul y la roja indican respectivamente el patrón de corrida de las distintas especies en forma libre o unida a proteína. Las concentraciones de RecU y de las variantes se expresan en moles de dímero)

Los resultados mostrados indican que la región del tallo, en concreto los residuos Y80 y F81 son esenciales para el reconocimiento, unión estable y posterior distorsión y resolución de la HJ. Mutaciones en estos residuos dan lugar a proteínas que han perdido la especificidad de unión por las HJ, forman complejos ADN-proteína menos estables (RecUF81A) y la capacidad de resolución está prácticamente anulada.

4.2.4. RecUY80A y RecUF81A no interaccionan con RecA

Puesto que los residuos Y80A y F81 están localizados en la zona intermedia del tallo, y como se ha visto anteriormente, éste está implicado en la interacción con RecA, se esperaba que estos mutantes también estuvieran afectados en la modulación de RecA. Se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis de dATP y de intercambio de cadenas por RecA en presencia de los mutantes de RecU (Fig. 34).

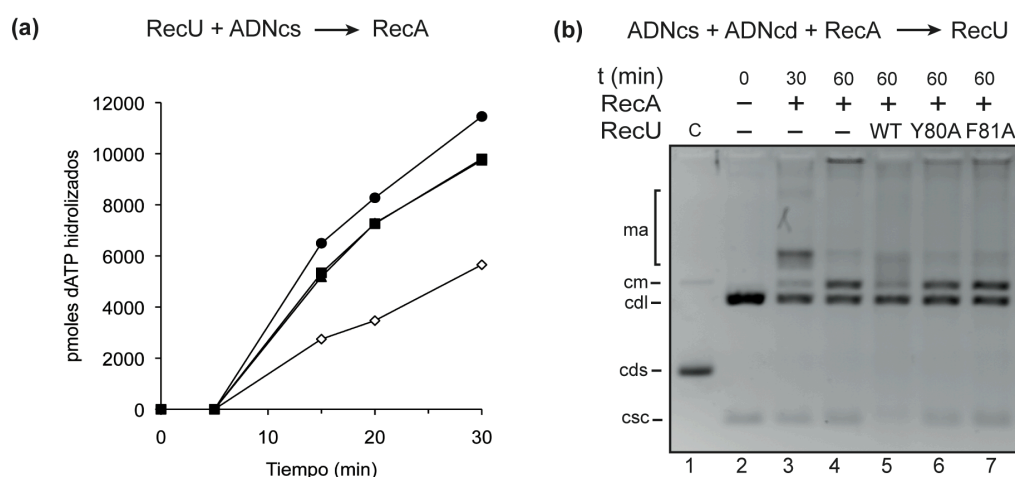


Figura 34. Interacción de los mutantes RecUY80A y RecUF81A con RecA. (a) Reacción de hidrólisis de dATP. Se preincubó ADNcs (10 μ M) con RecU las variantes de RecU (200 nM) en tampón D que contiene 10mM MgOAc₂, en presencia de 2 mM de dATP durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecA (1,3 μ M). La reacción se incubó 25 min más a 37°C y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. La hidrólisis de dATP se expresa en pmoles. (b) Reacción de intercambio de cadenas. Se preincubó ADNcs (10 μ M) y ADNcd lineal homólogo (20 μ M) con RecA (1,3 μ M) en presencia de 10 mM de MgOAc₂ y 2 mM de dATP durante 30 min a 37 °C. En ese momento se añadió RecU o las variantes de RecU (200nM) y la reacción se incubó 30 min más a 37 °C. Después de desproteinizar, las muestras se analizaron en un gel de agarosa del 0,8 %.

Ninguno de los mutantes es capaz de inhibir la reacción de hidrólisis de dATP dependiente de ADNcs (Fig. 34a) ni la reacción de intercambio de cadenas (Fig. 34b) llevada a cabo por RecA, lo que confirma la hipótesis de que el tallo comprende la región de interacción con RecA. Estos resultados coincidirían con los obtenidos en transformación plasmídica.

4.3. La interacción de RecU con la HJ impide la interacción con RecA

Los resultados mostrados hasta el momento indican que la región del tallo tiene una doble función en la actividad de RecU. Por un lado interviene en el reconocimiento y distorsión de las HJs (ver Figs. 29 y 33, McGregor *et al.* 2005) y por otro lado comprende la zona de interacción con RecA (ver Figs. 25 y 34).

En el modelo propuesto de interacción de RecU con la HJ se deduce que, una vez que RecU se encuentra unida a la estructura, el tallo quedaría alojado en la cavidad del centro, interaccionando con el ADN. Por tanto, no estaría accesible para interaccionar con RecA y no podría ejercer el efecto negativo sobre la actividad de RecA. Para confirmar esta idea, se llevó a cabo el ensayo de hidrólisis de RecA en presencia de RecU, ADNcs y HJ ADN(Fig. 35).

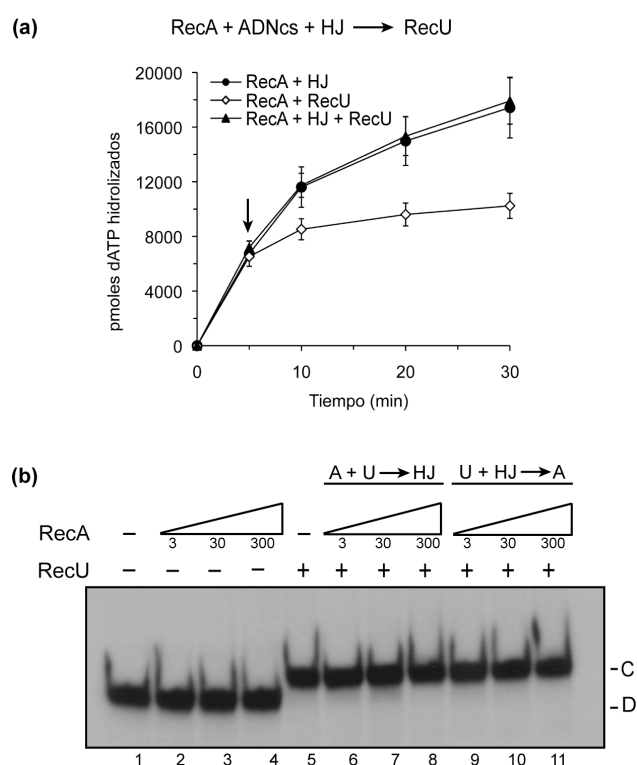


Figura 35. RecU no interacciona con RecA cuando está unida a HJ. (a) Se preincubó ADNcs (10 μM) y HJ (300 μM) con RecA (1,3 μM) en tampón D que contiene 10mM MgOAc₂, en presencia de 2 mM de dATP durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU (200 nM). La reacción se incubó 25 min más a 37°C y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. La hidrólisis de dATP se expresa en pmoles. La flecha indica el momento de adición de RecU. (b) Se incubaron concentraciones crecientes de RecA junto con RecU (3 nM en mol de monómero) durante 10 min a 37°C en tampón A que contiene 1 mM de MgCl₂. A continuación se añadió la HJ3 que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5' y se incubó la reacción durante 10 min más (carriles 6 al 8). En la reacción inversa se incubó primero RecU (3nM) junto con la HJ3 durante 10 min a 37°C y posteriormente se añadió RecA y se incubó la reacción durante 10 min (carriles 9 al11). Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. - y + indican ausencia y presencia de proteína D: ADN libre; C: complejo proteína-HJ.

Como se puede observar en la figura 35a, cuando RecU se encuentra unida a la HJ no es capaz de inhibir la hidrólisis de dATP llevada a cabo por RecA. Ya que la HJ se añade desde el principio en la reacción y en el minuto 5 se añade RecU, teniendo en cuenta la alta afinidad de RecU por las HJs, RecU interaccionaría con el ADN. Al quedar la zona del tallo oculta, no podría interaccionar con RecA.

Se realizó el experimento opuesto, es decir, un ensayo de unión de RecU a HJ, en presencia de RecA (Fig. 35b). Independientemente del orden de adición en la reacción, tanto si se incubaba primero RecU con la HJ y luego se añade RecA, como al revés, si se incubaba RecA con RecU y luego se añade la HJ, el resultado es el mismo. RecA no es capaz de impedir la formación del complejo entre RecU y la HJ, incluso a altas concentraciones de RecA (300 nM), lo que indica que la afinidad de RecU por el sustrato es mucho mayor que la que hay entre RecU y RecA.

B. INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS DEL RESOLVASOMA

1. Actividad bioquímica de RuvA y RuvB

1.1. Estado oligomérico de RuvA y unión de RuvA a las estructuras de Holliday

En la fase post- sináptica de la RH tiene lugar la resolución de los intermediarios de recombinación formados por la actividad de RecA. Antes que tenga lugar la resolución tiene lugar la migración de ramas, catalizada por el complejo RuvAB. Está descrito que la primera proteína que reconoce las HJs es RuvA y la actividad bioquímica de la proteína, está caracterizada en otros organismos (Mitchell and West 1996; Ohnishi *et al.* 2000; Ingleston *et al.* 2002).

Puesto que no se había trabajado antes con la proteína RuvA de *B. subtilis*, lo primero que hizo fue sobreexpresar la proteína desde una cepa de *E. coli* BL21, que contiene el plásmido pET3b con el gen de *ruvA* (plásmido pCB632). Posteriormente se llevó a cabo la purificación de la proteína mediante un protocolo que incluye diferentes pasos de cromatografía. Una vez purificada, se analizó el estado oligomérico de la proteína en un ensayo de entrecruzamiento con DSS (Fig. 36).

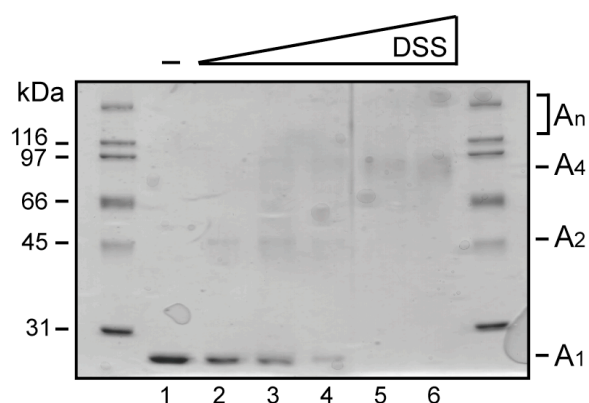


Figura 36. Estado oligomérico de RuvA. Se incubó RuvA (2 μ M en moles de monómero) en tampón E que contiene 5 mM EDTA con 50 mM NaCl, durante 10 min a 4 $^{\circ}$ C. Se añadieron concentraciones crecientes de DSS (de 35 a 500 μ M) y se incubó la reacción durante 10 min a 37 $^{\circ}$ C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante tinción con azul de Coomassie. - indica ausencia de DSS. A₁, A₂, A₄ y A_n indican los distintos estados oligoméricos de RuvA (monómero, dímero, etc).

El gen de *ruvA* de *B. subtilis* codifica para una proteína de 22,5 kDa. En un gel SDS-PAGE el monómero (A₁) migra a una altura cercana al marcador de 31 kDa (Fig. 36, calle 1). Al añadir concentraciones crecientes de DSS se observa como va

desapareciendo la banda correspondiente al monómero y se detectan otras de mayor peso molecular, primero de 45 kDa que corresponderían al dímero (A_2) y de 90 kDa que correspondería al tetrámero (A_4).

Se analizó la capacidad de unión de la proteína a las HJ (Fig. 37). RuvA presenta una alta afinidad de unión a HJ, con una $K_{app} = 67$ nM (moles de tetrámero). Cuando se incubó RuvA junto con la estructura HJ3 se observan dos tipos de complejos con el ADN. A medida que se aumenta la concentración de proteína primero se detecta un complejo de movilidad más rápida (CI) que podría corresponder a un tetrámero de RuvA unido al ADN ($RuvA_4$ -HJ). A las concentraciones más altas se detecta un complejo de menor movilidad (CII) que podría corresponder a dos tetrámeros de RuvA unidos al ADN ($RuvA_8$ - HJ) o alguna estructura híbrida.

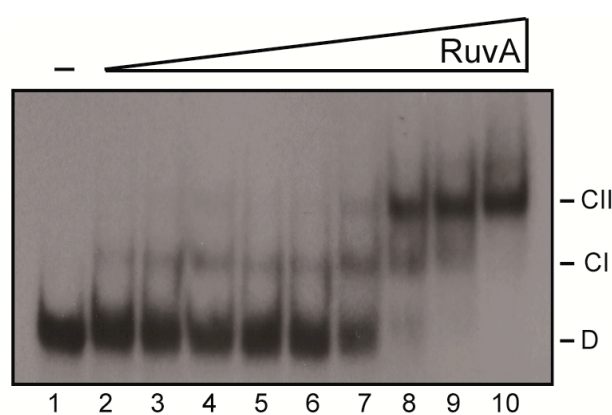


Figura 37. Unión de RuvA a HJs. Se incubaron concentraciones crecientes de RuvA (de 1,8 a 480 nM en moles de tetrámero) junto con la HJ3 que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5'. La reacción se incubó durante 20 min a 37°C en tampón E que contiene 5 mM de EDTA. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. D: ADN libre; CI: complejo $RuvA_4$ -HJ; CII: complejo $RuvA_8$ - HJ.

Alternativamente se analizó la unión de RuvA a HJs mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM), técnica muy útil que permite visualizar directamente complejos ADN-proteína. La estructura HJ3 que ha sido utilizada en los anteriores ensayos *in vitro* tiene una longitud de brazos de 40 pb, y al visualizarla en el microscopio puede quedar oculta por encontrarse unida a las proteínas. Por lo que para los ensayos de AFM es necesario el uso de una HJ de mayor longitud de brazos. Para la construcción de estas estructuras se siguió un protocolo ya descrito (McCulloch *et al.* 1994; Zerbib *et al.* 1997), en el cual se emplea la cepa de *E. coli* RM40 que contiene el plásmido pSD115. Este plásmido de 4,95 kb, contiene dos repeticiones directas del sitio de recombinación *cer*, dianas de la recombinasas específicas de sitio XerC y XerD. Se creció un cultivo de esta cepa y se indujo la síntesis de XerC, clonada en el cromosoma bajo el promotor *lac*. La recombinasa da lugar mediante recombinación intramolecular a la conversión parcial del plásmido en dos productos de recombinación, de tamaños 2,6 y 2,35 kb. Se generan además

Resultados

los intermediarios “figura-8” que contienen una HJ, como resultado de eventos de recombinación incompletos (Fig. 38a). La HJ contiene una zona de homología en el punto de entrecruzamiento de 300 pb, que por tanto puede migrar. Mediante digestión con la enzima HindII, se genera la estructura de 4 ramas o estructura X, en la que la longitud teórica de cada rama, denominadas R1, R2, R3 y R4, calculada asumiendo que el sitio de entrecruzamiento se localiza en el sitio *cer*, es de 620, 773, 1565 y 1990 respectivamente (fig. 38d) (McCulloch *et al.* 1994).

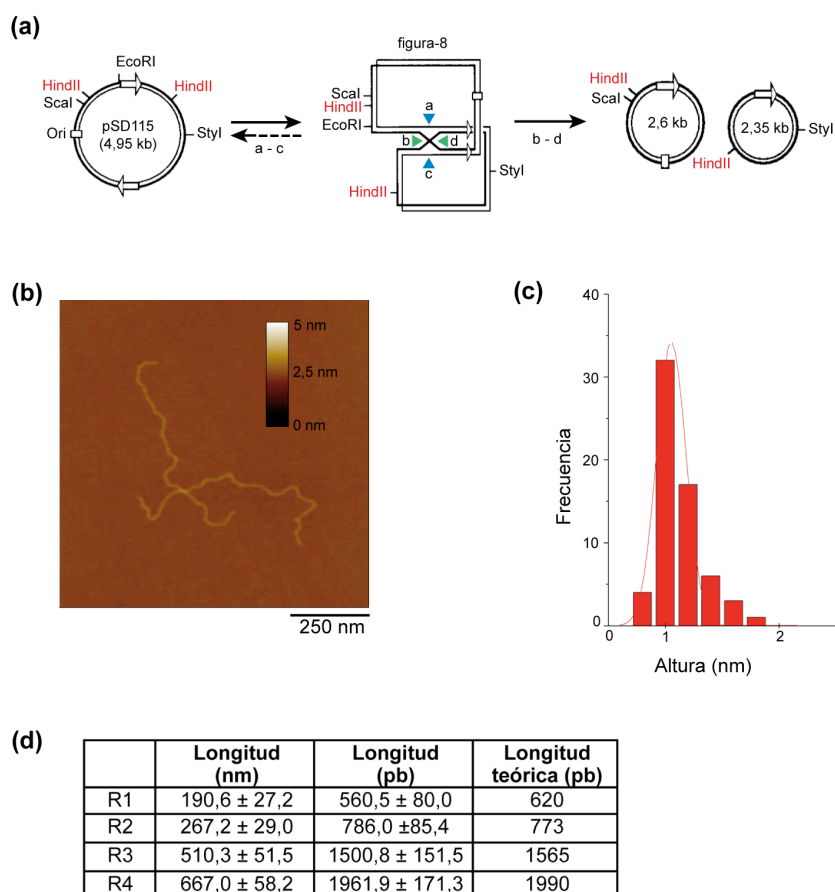
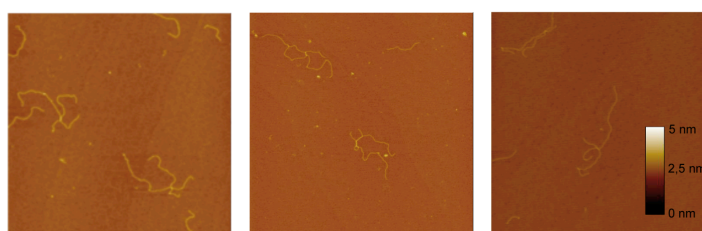


Figura 38. Generación y visualización por AFM de HJs largas. (a) Esquema del proceso de obtención *in vivo* de las estructuras-X (adaptado de Zerbib *et al.* 1997). La inducción de la recombinasa XerC promueve recombinación intramolecular entre los sitios *cer* en el plásmido pSD115, dando lugar como producto intermedio a la estructura figuras-8 y como productos finales dos plásmidos de tamaño 2,6 y 2,35 kb. La figura-8 a su vez puede servir de sustrato a endonucleasas, que dependiendo de la orientación del corte, a-c o b-d, generarán respectivamente el plásmido inicial o los dos plásmidos de menor tamaño. Las flechas blancas indican los sitios de recombinación *cer* y el cuadrado blanco el sitio *Ori*. (b) Imagen de AFM de una estructura-X. (c) Histograma de frecuencias de la altura del punto de entrecruzamiento de la estructura-X, realizado con el programa Origin 8.0, al igual que el ajuste a una distribución normal. (d) Tabla de la mediciones experimentales y teóricas de las ramas de la estructura-X.

Una vez purificadas las estructuras X, se visualizaron por AFM (Fig. 38b) y se midieron las longitudes de los brazos de la estructuras, utilizando el software

informático Nanoscope IIIa (Veeco), que resultaron ser ~ 191 , 267 , 510 y 667 nm, para R1, R2, R3 y R4 respectivamente ($n = 30$). A partir de estas mediciones se calcularon las longitudes en pb, resultando en 560 , 786 , 1501 y 1962 pb, valores muy cercanos a los teóricos (Fig. 38d). Se midió también la altura del punto de entrecruzamiento, para la que se obtuvo un valor medio de $0,55 \pm 0,12$ nm ($n = 63$) (Fig. 38c). Una vez realizadas las mediciones de longitud de las ramas y altura del punto de entrecruzamiento en ausencia de proteína, se realizó un ensayo de unión de RuvA a estructuras-X (Fig. 39).

(a) Estructura-X



(b) Estructura-X + RuvA

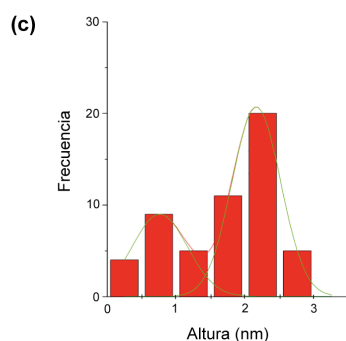
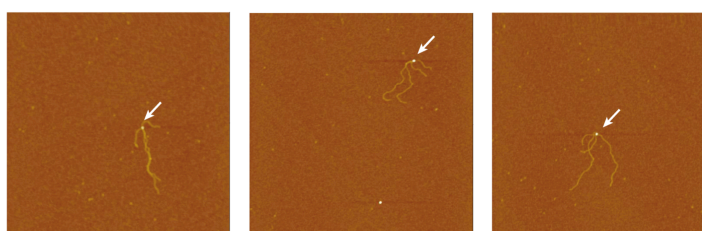


Figura 39. Unión de RuvA a estructuras-X. Se incubó el sustrato de estructuras-X purificadas en ausencia (a) o presencia de RuvA (20 nM en moles de tetrámero) (b) en tampón Tris HCl pH7,5 50 mM con 1 mM MgCl₂ y 50 mM NaCl, durante 20 min a 37°C. Las flechas indican los complejos ADN-proteína. (c) Histograma de frecuencias de alturas del punto de entrecruzamiento de la estructura-X realizado con el programa Origin 8.0, al igual que el ajuste a una distribución normal. La barra corresponde a 0,5 μ m

Como se observa en la Fig. 39b, cuando las estructuras-X se incuban en presencia de RuvA, se detecta la unión clara y específica de la proteína al punto de entrecruzamiento, lo que coincide con los datos publicados para otras proteínas

RuvA (Rafferty *et al.* 1996; Ariyoshi *et al.* 2000). Se realizaron las mediciones de la altura del punto de entrecruzamiento de las muestras en las que estaba presente RuvA, se representaron en un histograma (Fig. 39c) y se ajustó la distribución normal. Se detectan dos grupos de datos, un grupo con una altura media de 0,76 nm y otro grupo de altura media 2,15 nm. Puesto que se calculó una altura media del punto de entrecruzamiento de 0,55 nm (ver fig. 38c), la población de datos con altura media de 0,76 nm correspondería en su mayoría a ADN libre de proteína. En cambio en el segundo grupo de datos, la altura media de 2,15 nm se debería a la unión de RuvA. Aunque a partir de estos datos no se puede determinar la naturaleza del complejo, éste podría tratarse de un tetrámero de RuvA unido al centro de la estructura. En las condiciones usadas no se detectaron complejos de mayor altura, por lo que no se puede correlacionar los dos complejos detectados con HJ pequeñas (Fig. 37) con éstos complejos (Fig. 39).

1.2. Actividad ATPasa de RuvB en presencia de RuvA

En *B. subtilis* el gen de *ruvB* codifica para una proteína de 37,5 kDa. En este caso la sobreexpresión de la proteína se hizo en *B. subtilis*. Esta cepa contiene el plásmido pDG148 que tiene clonado el gen de *ruvB* fusionado a 6 codones correspondientes a 6 histidinas en el extremo 3' del gen. Se comprobó que RuvB-His6x es funcional mediante un ensayo de complementación en MMS en la cepa $\Delta ruvB$.

Todas las proteínas RuvB descritas son helicasas hexaméricas y presentan actividad ATPasa que además se estimula en presencia de ADN y de RuvA (Mitchell and West 1994). Se midió la actividad de hidrólisis de ATP mediada por RuvB. Se confirmó que aunque RuvB por sí sola tiene una débil actividad ATPasa, en presencia de ADNcd superenrollado y de RuvA aumenta la hidrólisis hasta cuatro veces, alcanzándose el pico de actividad en una relación hexámeros de RuvB : tetrámeros de RuvA de 1:6 (Fig. 40).

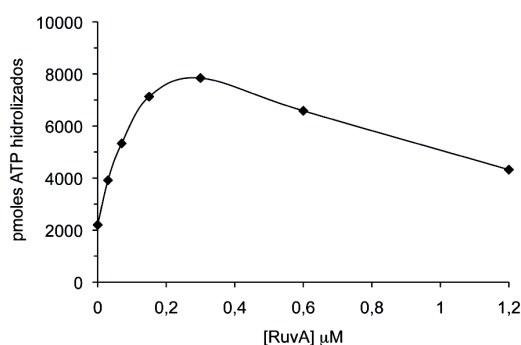


Figura 40. Actividad ATPasa de RuvB. Se incubó RuvB (40 nM) en tampón I que contiene 10mM MgOAc₂ en presencia de 150 μM de ADNcd superenrollado pHP13 y concentraciones crecientes de RuvA (de 0,03 a 1,2 μM en moles de tetrámero) durante 30 min a 37°C. La hidrólisis de ATP se expresa en pmoles.

1.3. Actividad helicasa del complejo RuvAB

La hidrólisis de ATP es necesaria para la actividad helicasa de RuvB, que a su vez se necesita para la migración de las ramas de la HJ (Parsons *et al.* 1992; Hishida *et al.* 1999). RuvB de *E. coli* se une formando anillos sobre la doble cadena de ADN en la HJ a cada lado de RuvA (Parsons *et al.* 1992; Hishida *et al.* 1999) y entonces el complejo catalizaría la migración del punto de entrecruzamiento. Se analizó la capacidad del complejo RuvAB de disociación de HJs (Fig. 41). Al incubarse la estructura HJ3 en presencia de RuvA y RuvB se observa la desaparición de la estructura y la aparición de un producto de migración más rápida. Este producto corresponde con una estructura tipo “flayed” (o forma Y). El centro de la HJ se desplaza hasta el final, resultando en dos productos exactamente iguales. La proporción de producto aumenta a medida que aumenta la concentración de RuvA y no se observa producto en ausencia de RuvA. Por lo que para que tenga lugar la actividad helicasa de RuvB, es necesaria la presencia de RuvA. Esta podría reclutar a RuvB y/o estabilizar su unión al ADNcd.

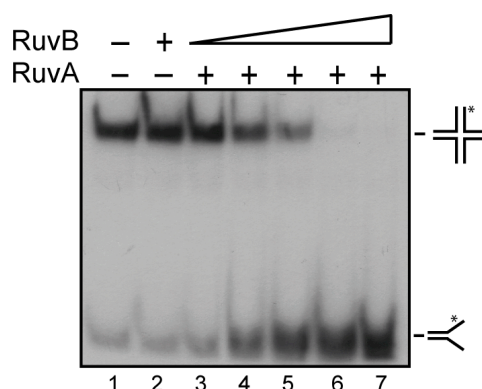


Figura 41. Actividad helicasa de RuvAB. Se incubó la estructura HJ3 junto con RuvA (12,5 nM en moles de tetrámero) junto con cantidades crecientes de RuvB (de 1,25 a 40 nM en moles de hexámero). La reacción se incubó durante 30 min a 37°C en tampón I que contiene 10mM MgOAc₂ en presencia de 1 mM de ATP. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía.

1.4. Formación del complejo RuvAB-HJ *in vitro*

En la reacción helicasa llevada a cabo en el apartado anterior no es necesario un paso de desproteización antes del análisis en geles ndPAGE. Esto está indicando que el complejo que forman RuvAB sobre la HJ es muy inestable o dinámico. RuvA se une a la HJ, induce el cargado de RuvB y en presencia de ATP llevan a cabo la migración de ramas. Una vez catalizada la reacción y la estructura ha sido disociada, el complejo se desensambla. Debido a este dinamismo, sólo es posible detectar el complejo de RuvA y RuvB usando un análogo no hidrolizable del ATP, como es el ATPγS o fijando el complejo mediante adición de glutaraldehído (Parsons and West 1993; Hiom and West 1995; Han *et al.* 2001). Para detectar *in vitro* la formación del complejo entre RuvA y RuvB, se llevó a cabo el ensayo de

Resultados

actividad helicasa en presencia de ATP γ S seguido de un paso de fijación con glutaraldehído en presencia de una cantidad fija de RuvB y variable de RuvA (Fig. 42).

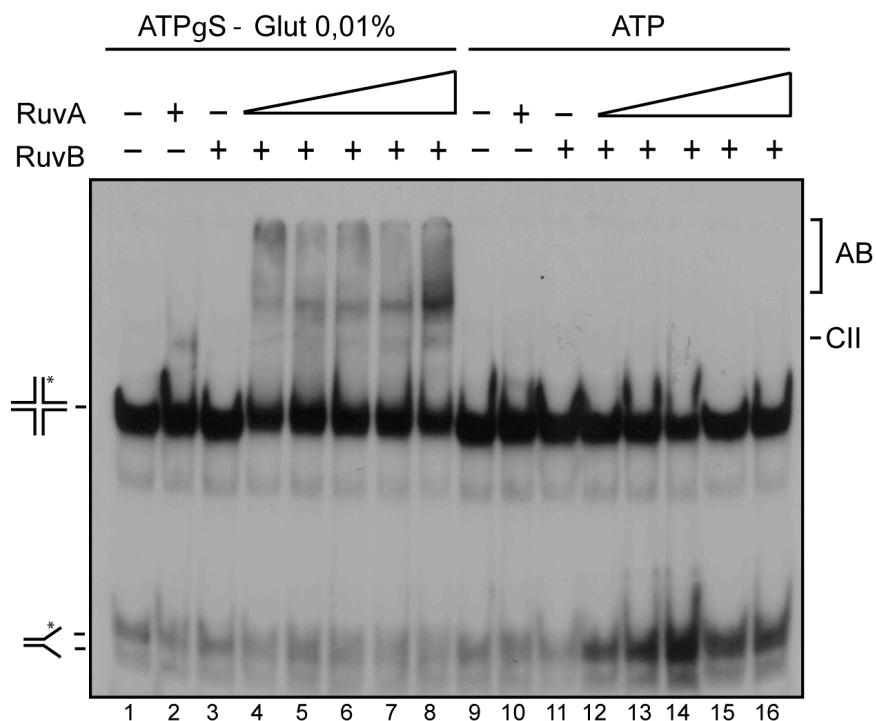


Figura 42. Unión del complejo RuvAB a HJs. Se incubó RuvB (5 nM en moles de hexámero) junto con concentraciones crecientes de RuvA (de 2,5 a 40 nM en moles de tetrámero) junto con la estructura HJ3. La reacción se incubó durante 30 min a 37°C en tampón I que contiene 10mM MgOAc₂ en presencia de 1 mM de ATP (carriles 9 al 16) o de 1 mM ATP γ S (carriles 1 al 8). En este último caso tras la reacción se añadió glutaraldehído al 0,01% y se incubó durante 20 min más a 37°C. Las muestras se cargaron en un gel ndPAGE al 6 % y se analizaron por autorradiografía. CI: complejo RuvA₄ - HJ; CII: complejo RuvA₈ - HJ; AB: complejo RuvAB - HJ.

En las condiciones probadas, no se detecta unión de RuvB sola a la estructura HJ3 (Fig. 42, calle 3), lo que indica que se puede tratar de un complejo inestable o que no tiene la suficiente afinidad por el sustrato. En el caso de RuvA sola, se detecta el complejo CII (quizás dos tetrámeros de RuvA unidos a la HJ) (Fig. 42, calle 2). Cuando se incubaba RuvB con concentraciones crecientes de RuvA en presencia de ATP se detecta la aparición del producto de reacción, la estructura tipo flayed (Fig. 42, calles 12-16). Si la misma reacción se lleva a cabo en presencia de ATP γ S y además se añade un paso de fijación con glutaraldehído al 0,01%, se observa la aparición de una banda de menor movilidad, distinta al complejo que forma RuvA con la HJ (Fig. 42, calles 4-8). Esta banda, que aumenta a medida que aumenta la concentración de RuvA podría corresponder a un complejo formado por RuvA y RuvB sobre la HJ, aunque no se puede saber la estequiometría exacta del complejo.

2. Interacción funcional entre RuvAB y RecU

2.1. Formación del complejo RuvA-RuvB-RecU *in vitro*

En *E. coli* se ha sugerido la existencia del complejo RuvABC (Eggleston *et al.*, 1997; Zerbí *et al.*, 1998). Una vez caracterizadas la actividad bioquímica de cada proteína por separado, se continuó con el estudio de las posibles interacciones funcionales entre el complejo translocasa y la resolvasa en *B. subtilis*. Lo primero que se hizo fue determinar si las tres proteínas formaban un complejo *in vitro*. Mediante ensayos de entrecruzamiento de proteínas con DSS realizados en este trabajo se ha podido demostrar una interacción directa entre RecU y RuvB. Esa interacción no se detecta en el caso del mutante RecUA1-32 y se encuentra disminuída en el mutante RecUR31A (ver fig. 19). En cambio, la interacción se encuentra inalterada en el caso de los mutantes del tallo RecUY80A y RecUF81A (ver fig. 31), lo que indica que la región de interacción con RuvB reside en la región amino terminal de RecU.

Con objeto de detectar un posible complejo RuvA-RuvB-RecU se llevó a cabo el mismo ensayo de entrecruzamiento con DSS en presencia de las tres proteínas (Fig. 43). Como se había observado anteriormente, RuvB y RecU forman un complejo que se detecta como una banda de 62 kDa, que correspondería con un monómero de RuvB (37,5 kDa) interaccionando con un monómero de RecU (24 kDa) (Fig. 43, calle 5). Cuando se incuban RuvA y RuvB en presencia de DSS no se observa la aparición de ninguna banda nueva (calle 4) que pudiera corresponder a un complejo RuvAB, si se compara con RuvB sola en presencia de DSS (Fig. 43, calle 2). Cuando se incuban las tres proteínas en presencia de DSS (Fig. 43, calle 7) se observa el mismo patrón de bandas que en el caso de RuvB + RecU, es decir, solamente se observa el complejo RuvB-RecU. No se detecta una banda que pudiera corresponder a un complejo de las tres proteínas.

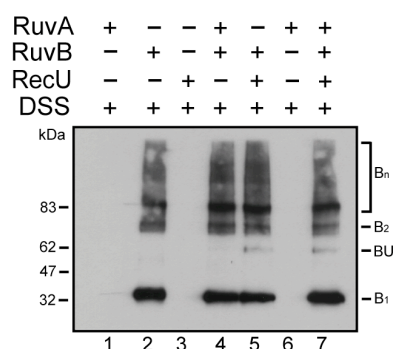


Figura 43. Entrecruzamiento de las proteínas RuvA, RuvB y RecU con DSS. Se incubó RuvA (1 μ M), RuvB (0,6 μ M) o RecU (0,8 μ M) o combinaciones de éstas en tampón I que contiene 10 mM MgOAc₂ con 90 mM NaCl y 2 mM ATP, durante 10 min a 4 °C. Se añadió DSS a 125 μ M y se incubó la reacción durante 10 min más a 37 °C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se reveló mediante western blot usando anticuerpos anti-His (anti-RuvB). - y + indican respectivamente ausencia o presencia de proteína o DSS. B₁, B₂, B_n indican los distintos estados oligoméricos de RuvB (monómero, dímero, etc). BU indica el complejo formado por RecU y RuvB.

2.2. Unión de RecU a HJs en presencia de RuvA y RuvB

Tanto RecU como RuvA son proteínas que tienen una alta afinidad de unión a estructuras ramificadas, en concreto a HJs (Parsons *et al.* 1992; Ayora *et al.* 2004). Se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con objeto detectar un posible complejo de ambas proteínas sobre la HJ o si por el contrario, la unión a la HJ es mutuamente excluyente (Fig. 44).

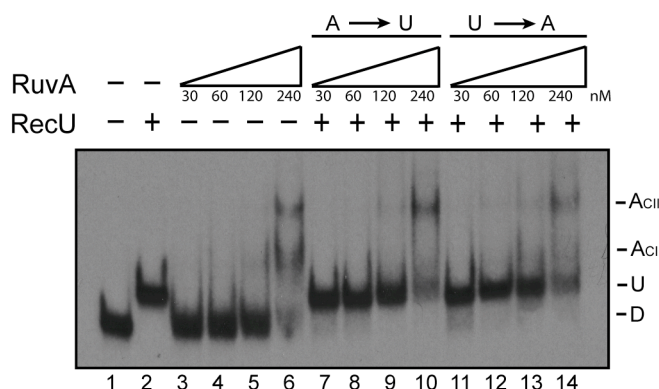


Figura 44. Unión de RuvA y RecU a HJs. Se incubaron concentraciones crecientes de RuvA (de 30 a 240 nM en moles de tetrámero) junto con la HJ3 que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5' en tampón E que contiene 5 mM de EDTA con 50 mM NaCl durante 5 min a 37°C. En ese momento se añade RecU (3nM en moles de dímero) y se incuba la reacción durante 20 min más a 37°C (calles 7 al 10). En la reacción inversa primero se preincubó RecU con la HJ y después se añadió RuvA (calles 11 al 14). Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. D: ADN libre; U: complejo RecU-HJ; A_{CI}: complejo RuvA₄-HJ; A_{CII}: complejo RuvA₈-HJ.

Para realizar el ensayo se usó una concentración de RecU a la cual todo el sustrato se encuentra acomplejado con la proteína, esto es 3 nM (Fig. 44, calle 2). Como se puede observar, RecU solamente forma un tipo de complejo, que correspondería al un dímero de RecU unido a la HJ. Por otro lado, se utilizaron concentraciones crecientes de RuvA (Fig. 44, calles 3 al 6). Como se ha visto en apartados anteriores, RuvA forma dos tipos de complejos, uno de movilidad más rápida, que correspondería a un tetrámero de RuvA unida a la estructura de Holliday (A_{CI}) y otro de movilidad más lenta que correspondería a dos tetrámeros de RuvA unidos cada uno a un lado de la HJ (A_{CII}). Cuando se incuban las dos proteínas juntas, se observa que desaparece la banda correspondiente al complejo A_{CI}, independientemente del orden de la reacción (Fig. 44, calles 6, 10 y 14). Esto se podría explicar en el caso de que RuvA y RecU interaccionaran a la vez sobre la HJ, un tetrámero de RuvA en una cara y un dímero de RecU en la otra. Si la teoría fuera correcta se debería detectar una banda nueva de migración intermedia entre A_{CI} y A_{CII}, pero esto no ocurre. Por lo que a partir de este ensayo no se puede confirmar la formación de un complejo RuvA-RecU-HJ.

A continuación se analizó la unión de RecU a HJs en presencia de RuvB (Fig. 45). Cuando se incubaba RuvB con la HJ no se observa ningún retardo del sustrato, lo

que indicaría que la proteína no tiene suficiente afinidad por la HJ o si forma un complejo, no se detecta por la inestabilidad del mismo (Fig. 45, calle 3). Cuando se incubó RecU junto con la HJ en presencia de RuvB, se observa la aparición de una banda de menor movilidad, distinta a la del complejo RecU-HJ, que podría corresponder con un complejo RecU-RuvB-HJ (Fig. 45, calles 7 al 10). Si se añade RuvA a la reacción esta banda no se detecta (Fig. 45, calles 11 al 14), lo que indicaría que RuvA está inhibiendo la formación del complejo RecU-RuvB-HJ, posiblemente compitiendo con RecU en la interacción con RuvB.

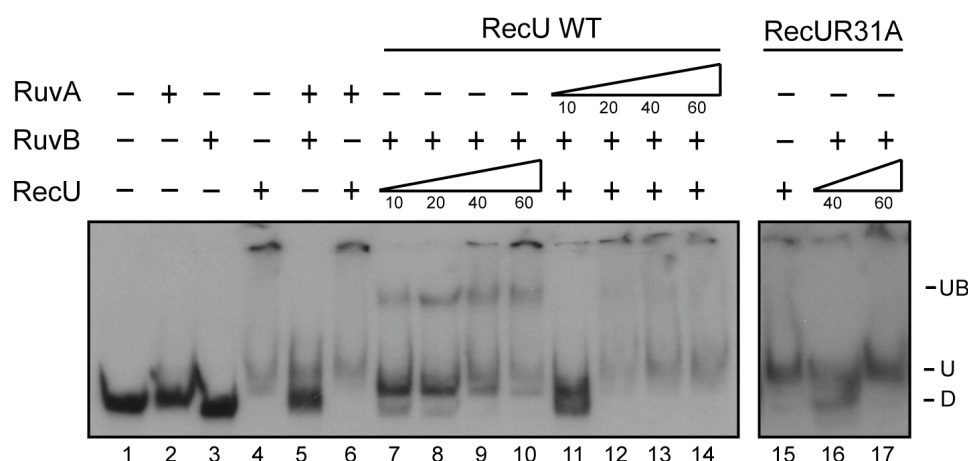


Figura 45. Unión de RecU a HJs en presencia de RuvA y RuvB. Se preincubó RuvB (40 nM en moles de hexámero) junto con la HJ3 que contiene el oligonucleótido JO 3.4 marcado en el extremo 5' en tampón J que contiene 15 mM de CaCl_2 con 50 mM NaCl y 1 mM $\text{ATP}\gamma\text{S}$ durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU en concentraciones crecientes (10, 20, 40 y 60 nM en moles de dímero) y se incubó la reacción durante 15 min más. Cuando RuvA está presente en la reacción, primero se preincubó RuvB (40 nM) con la HJ durante 5 min a 37°C y posteriormente se añadió RecU (60 nM) y RuvA en concentraciones crecientes (10, 20, 40 y 60 nM en moles de tetrámero) y se incubó durante 15 min más. Las muestras se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. D: ADN libre; U: complejo RecU-HJ; UB: complejo RecU-RuvB-HJ.

Se ha visto en apartados anteriores que parece existir una interacción directa entre RuvB y RecU, y que la zona de interacción en RecU parece ser la región N-terminal. Prueba de ello es que RuvB no es capaz de estimular la reacción de corte del mutante RecU31A (ver fig. 18b) y que la interacción entre las dos proteínas se encuentra afectada (ver fig. 19). Se realizó el mismo ensayo de unión de RecU a HJs en presencia de RuvB con el mutante RecU31A y como se puede observar en la Fig. 45 (calles 15 al 17), no se observa la banda del complejo correspondiente a RecU-RuvB-HJ. Esto confirmaría la hipótesis de que la región de interacción con RuvB se encuentra en la región N-terminal de RecU y confirmaría que la banda que se detecta por entrecruzamiento con DSS corresponde a un complejo RuvB-RecU (ver Fig. 43)

Para conocer más acerca de la naturaleza del complejo RuvB-RecU, se llevaron a cabo estudios de microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Para ello se realizó un ensayo de unión a estructuras-X en presencia de las dos proteínas. Se incubó el sustrato, la estructura-X, en presencia de RuvB, de RecU o ambas (Fig. 46). Cuando se incubaba la estructura-X en presencia de RecU, se detecta un complejo sobre el punto de entrecruzamiento, que tras el análisis de datos, corresponde con un complejo de altura media $1,07 \pm 0,33$ nm ($n= 150$), que correspondería con un dímero de RecU. La unión de RecU a la estructura es muy específica y sólo se produce en el centro de la misma (Fig. 46a y c). Cuando se incubaba la estructura-X en presencia de RuvB se observa que RuvB se une inespecíficamente a los brazos de la estructura (Fig. 46b), lo que coincide con resultados obtenidos anteriormente para otras proteínas RuvB en los que se vio que RuvB une ADNcd y que éste estimula la actividad ATPasa de la proteína (Ohnishi *et al.* 2005). Cuando se incuban ambas proteínas junto con las estructuras-X en presencia de 1 mM ATP γ S, se detecta la formación de un complejo de mayor tamaño en el punto de entrecruzamiento (Fig. 46c). El análisis de los datos reveló que la muestra contenía dos tipos de complejos, que corresponderían a dos tipos de complejos sobre el punto de entrecruzamiento: el complejo denominado UBI, con una altura media $2,73 \pm 0,08$ nm y el complejo denominado UBII, con una altura media de $6,67 \pm 0,26$ nm (Fig. 46e). Ambos complejos son de tamaño claramente mayor a los detectados en el complejo RecU-HJ, lo que estaría indicando la presencia y por tanto la interacción de ambas proteínas en el centro de la estructura, lo que coincidiría con el ensayo *in vitro* mostrado anteriormente, en el que se detecta mediante ensayos de retardo en gel, un complejo RecU-RuvB-HJ (ver Figura 45).

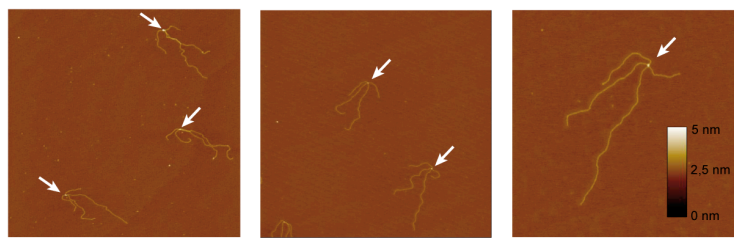
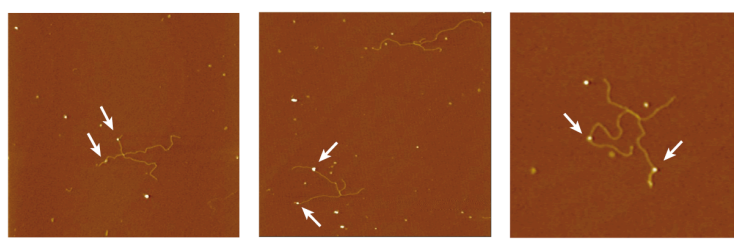
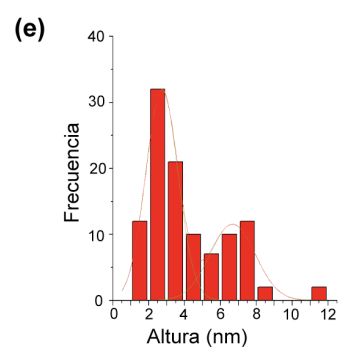
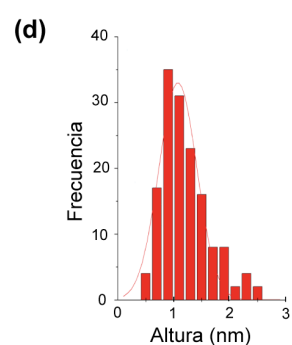
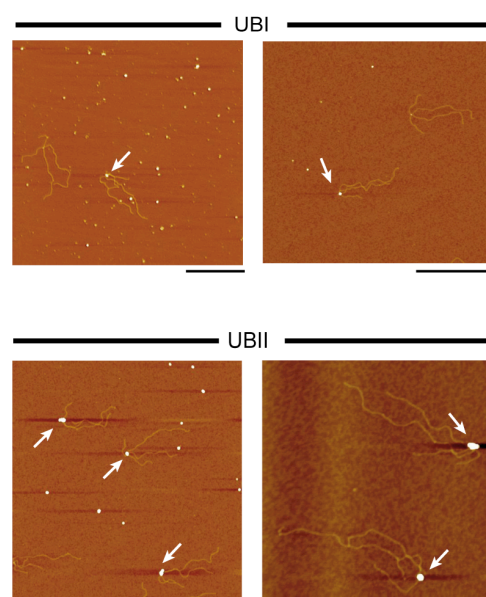
(a) Estructura-X + RecU**(b) Estructura-X + RuvB****(c) Estructura-X + RecU + RuvB**

Figura 46. Visualización del complejo RecU-RuvB-HJ mediante AFM. El sustrato de estructura-X se incubó en presencia de RecU (20 nM en moles de dímero) **(a)**, RuvB (5 nM en moles de hexámero) **(b)** o en presencia de ambas proteínas en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 1 mM ATPγS **(c)** durante 10 min a 37°C. **(d)** Histograma de frecuencias de las alturas del punto de entrecruzamiento en el complejo RecU-HJ. **(e)** Histograma de frecuencias de las alturas del punto de entrecruzamiento en el complejo RecU-RuvB-HJ. UBI y UBII indican los dos tipos de complejos detectados para el complejo RecU-RuvB-HJ. La barra corresponde a 0,5 μm. Las flechas indican los complejos ADN-proteína.

2.2. Resolución de HJs por RecU en presencia de RuvA y RuvB

Aunque no se ha detectado una interacción directa entre RuvA y RecU y tampoco se ha detectado la coexistencia de ambas proteínas sobre HJs, se llevaron a cabo ensayos de resolución de HJs, para analizar un posible efecto de RuvA sobre la actividad de corte de RecU (Fig. 47).

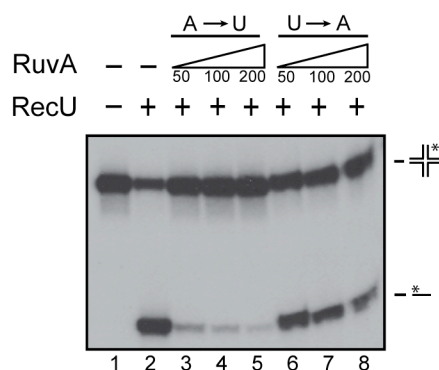


Figura 47. RuvA inhibe el corte de Hjs llevado a cabo por RecU. Se preincubaron concentraciones crecientes de RuvA (50, 100, 200 nM en moles de tetrámero) junto con la HJ3 marcada en el oligonucleótido J03.4 en el extremo 5', en tampón B que contiene 10 mM de $MgCl_2$ con 50 mM NaCl durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU (100 nM en moles de dímero) y se incubó la reacción durante 30 min más (carriles 3 al 5). En la reacción inversa, se preincubó primero RecU (100 nM) con la HJ y posteriormente se añadió RuvA en concentraciones crecientes (50, 100, 200 nM). Las muestras se analizaron mediante dPAGE al 15% y se reveló por autorradiografía.

En el ensayo realizado RecU corta la HJ3 con una alta eficiencia, $\sim 60\%$ (Fig. 47, calle 2), ya que la estructura utilizada está marcada en el oligonucleótido 4, que es el que contiene la secuencia de corte que reconoce RecU (Ayora *et al.* 2004). Cuando se añade RuvA a la reacción, se observa una menor acumulación de producto final a medida que aumenta la concentración de RuvA (calles 6 al 8), llegando a una eficiencia de corte de $\sim 25\%$ cuando RuvA se encuentra en relación 2:1 respecto a RecU (Fig. 47, calle 8). Este efecto inhibitorio aumenta cuando RuvA se preincuba con la HJ (Fig. 47, calles 3 al 5), llegando a inhibirse casi totalmente cuando la relación RuvA: RecU es 2: 1 (Fig. 47, calle 5). Debido a que la afinidad de unión de RecU ($K_{app} = 0,8$ nM) a HJs es mucho mayor que la de RuvA ($K_{app} = 67$ nM), puede que la capacidad de inhibición de la reacción de resolución sea debido a una interacción directa entre las proteínas.

La introducción de cortes simétricos en la HJ por parte de la resolvasa es imprescindible para que haya una correcta segregación de las moléculas de ADN implicadas. De otro modo la resolución podría llevar a la generación de cromosomas diméricos. Mediante la realización de ensayos de corte de HJs en geles desnaturizantes se ha demostrado que RuvB estimula la actividad de resolución de Hjs llevada a cabo por RecU (ver Figs. 18b, 21c y 30b), pero no permiten medir el nivel de simetría del corte. Por lo que se realizaron ensayos de resolución de HJs en

geles nativos. De esta forma si el corte es simétrico se generarán dos duplex de ADN distintos producidos por el corte en dos de las cadenas, que en un gel nativo migrarán a la misma altura (Fig. 48).

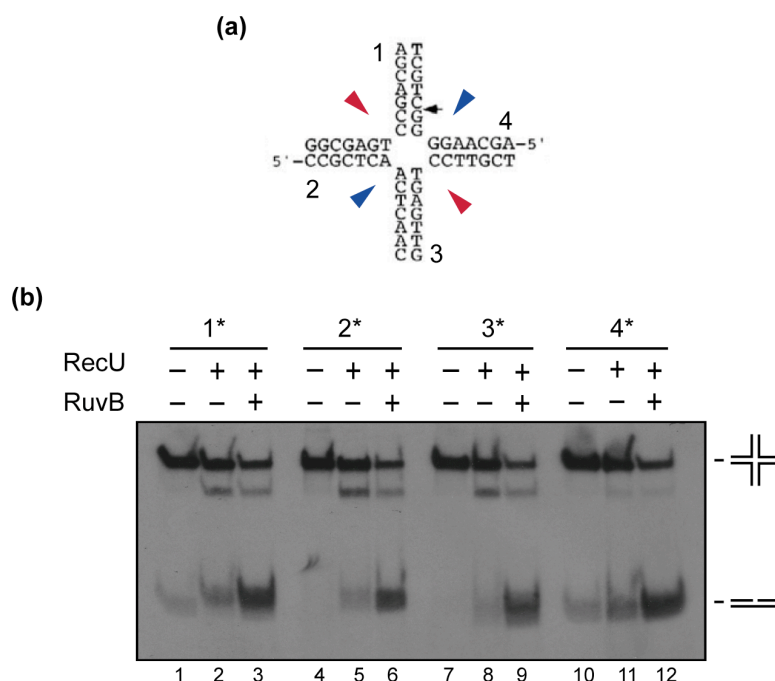


Figura 48. Resolución de Hjs por RecU en presencia de RuvB. (a) Secuencia de la región central de la HJ3, formada por los oligonucleótidos J03.1, J03.2, J03.3 y J03.4. La flecha negra indica el sitio de corte preferente de RecU. Los triángulos rojos y azules muestran las dos posibles orientaciones del corte. (b) Ensayo de corte de HJs. Se preincubó RuvB (40 nM en moles de hexámero) junto con cuatro HJs cada una marcada en uno de los cuatro oligonucleótidos, en tampón B que contiene 10 mM de $MgCl_2$ con 50 mM NaCl y 1 mM $ATP\gamma S$ durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU (100 nM) y se incubó la reacción durante 30 min más. Las muestras se desproteinizaron, se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. - y + indican ausencia y presencia de proteína; 1*, 2*, 3* y 4* indican el oligonucleótido marcado en cada HJ.

Debido a que RuvB sola no tiene ninguna actividad sobre HJs (ver Fig. 41) y que además la reacción se lleva a cabo en presencia de $ATP\gamma S$, los productos detectados solamente pueden ser resultado de la acción de RecU. En presencia de RecU se observa, aunque en una proporción muy baja, la aparición de productos que corresponderían a un duplex de ADN, y por tanto resultado de un corte simétrico (calles 2, 5, 8 y 11), como ya se había descrito anteriormente (Ayora *et al.* 2004). Es decir el corte en la cadena 1 quedaría acoplado al de la cadena 3, y el corte en la cadena 2 quedaría acoplado al de la cadena 4. También se detecta una banda de movilidad algo más rápida que la HJ. Esta banda correspondería una estructura de 3 ramas, que sería resultado de un único corte en la HJ y desanillado de la cadena cortada. En presencia de RecU y RuvB se observa que ésta estimula la reacción de corte llevada a cabo por RecU (calles 3, 6, 9 y 12). Además se observa que la banda

Resultados

correspondiente a la estructura de 3 ramas disminuye, lo que quiere decir que RuvB está favoreciendo una resolución simétrica de la estructura.

Una vez analizado el efecto que tienen RuvA y RuvB por separado sobre la actividad de corte de HJs de RecU, se analizó el efecto del complejo RuvAB sobre esta actividad, analizando la reacción en geles nativos (Fig. 49).

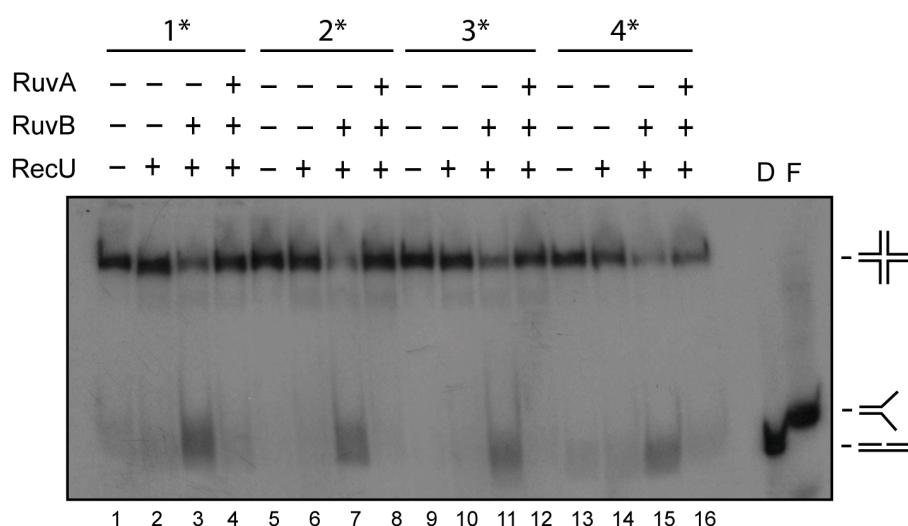


Figura 49. Resolución de HJs por RecU en presencia de RuvA y RuvB y ATP γ S. Se preincubó RuvB (40 nM) junto con cuatro HJs cada una marcada en uno de los cuatro oligos, en tampón B que contiene 10 mM de MgCl₂ con 50 mM NaCl y 1 mM ATP γ S durante 5 min a 37°C. En ese momento se añadió RecU (100 nM en moles de dímero) y se incubó la reacción durante 30 min más. En la reacciones en las que está presente RuvA, primero se preincubó RuvB (40 nM) con la HJ3 durante 5 min a 37°C y posteriormente se añadió RecU (100 nM) y RuvA (100 nM) y se incubó durante 30 min más. Las muestras se desproteinizaron, se analizaron mediante nPAGE al 6 % y se reveló por autorradiografía. La concentración de RuvA, RuvB y RecU se expresa en moles de tetrámero, hexámero y dímero respectivamente. - y + indican ausencia o presencia de proteína. F: ADN tipo flayed; D: ADN duplex.

Como se ha visto anteriormente, RuvB estimula la reacción de corte de RecU, favoreciendo una resolución simétrica (Fig. 49, calles 3, 7, 11 y 15). Los productos del corte son por tanto dos moléculas de ADN tipo duplex. Cuando RuvA está presente en la reacción a una concentración equimolar a RecU, se observa una inhibición de la actividad de corte (Fig. 49, calles 4, 8, 12 y 16). Debido a que la reacción se lleva a cabo en presencia de 1 mM de ATP γ S, la capacidad de migración de ramas se encuentra bloqueada, aunque el complejo RuvAB se puede ensamblar sobre la HJ (ver Fig. 42, Parsons and West 1993). Por otro lado, el hecho de que la HJ contenga la secuencia de reconocimiento próxima al punto de entrecruzamiento (ver Fig. 48a) hace prescindible la actividad de migración de ramas. De esta forma se establecería una interacción entre RuvB y RecU, estabilizándose el complejo sobre la HJ y permitiendo una resolución simétrica de la misma.

Por otro lado, aunque la presencia de RuvA inhibe la reacción de corte de RecU (ver Figs. 47 y 49), la actividad de migración de ramas es esencial para la reparación de DSBs en *B. subtilis* (Sánchez *et al.* 2005). Por lo que se realizó un ensayo de resolución de HJs en el que se empleó como sustrato las estructuras-X (Fig. 50). Como se ha comentado anteriormente la estructura-X contiene una zona de homología de 300 pb en el punto de entrecruzamiento, a través de la cual puede migrar, de esta forma se analiza la actividad de corte de RecU en presencia de RuvAB, en condiciones en las que se permite la actividad translocasa.

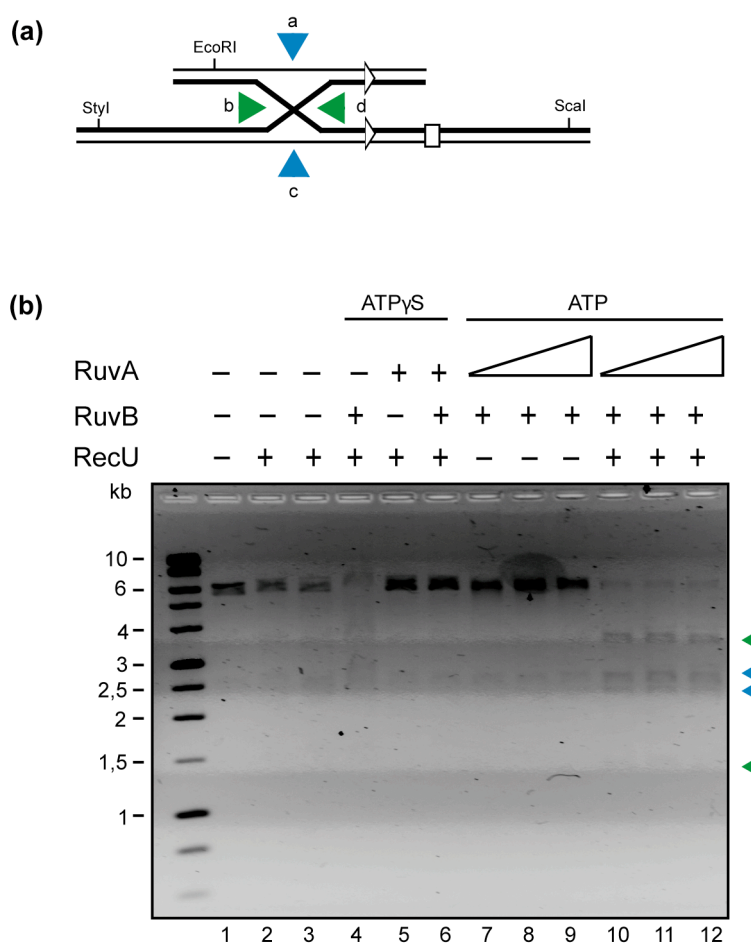


Figura 50. Resolución de estructuras-X por RecU en presencia de RuvA y RuvB. (a) Esquema de la estructura-X, donde se señalan las dos posibles orientaciones del corte: orientación a-c (en azul) u orientación b-d (verde). Los triángulos blancos indican los sitios de recombinación *cer* y el cuadrado blanco el sitio *ori*. (b) Ensayo de resolución de estructuras-X. Se incubaron combinaciones de RecU (100 nM en moles de dímero), RuvB (40 nM en moles de hexámero) o RuvA (12,5, 25 y 50 nM en moles de tetrámero) junto con la estructura-X, en presencia de 1 mM de ATP o ATP γ S en tampón B que contiene 10 mM de MgCl₂ (excepto para la calle 2 que contiene 1 mM MgCl₂), durante 60 min a 37°C. Después se desproteinizaron las muestras, se cargaron en un gel de agarosa al 0,8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Las flechas azules y verdes indican las dos posibles orientaciones de corte a-c y b-d.

Según la orientación del corte llevado a cabo por RecU, se pueden obtener distintos productos (Fig. 50a). Si la orientación es a-c, se generaría un fragmento de 2,6 kb y un fragmento de 2,35 kb. Si el corte es la orientación b-d, se generaría un fragmento de 1,4 kb y otro de 3,55 kb. Se ha visto la resolvasa Endo I de T7 y la resolvasa *EcoRuvC*, resuelven en la misma proporción ambas orientaciones (Zerbib *et al.* 1997).

Cuando se incuba RecU con la estructura-X no se observa resolución de la estructura, ni en condiciones de baja concentración de Mg^{2+} (1 mM) (Fig. 50, calle 2) o se detecta escasamente a alta concentración de Mg^{2+} (10 mM) (Fig. 50, calle 3). Cuando se incuba RecU en presencia de RuvB y ATP γ S (Fig. 50, calle 4), se observa una ligera disminución del sustrato inicial, que además parece algo retardado (y por tanto, no se ha producido una desproteización completa), pero no se observan los productos de corte, lo que podría indicar que ambas proteínas están interaccionando sobre las estructuras-X. En presencia de ATP γ S no se observa ningún efecto en la estructura-X, cuando ésta se incuba en presencia de RuvAB (Fig. 50, calle 5) o de RuvAB y RecU (Fig. 50, calle 6). Cuando se incuba RecU en presencia de RuvAB y ATP (Fig. 50, calles 10, 11 y 12), se observa la desaparición del sustrato y la aparición de los productos de corte predichos. Además no se observa una preferencia por una de las orientaciones de corte, puesto que se detecta la misma proporción de los productos de corte para ambas. Este resultado indicaría que cuando la región de reconocimiento de RecU no se encuentra próxima al punto de entrecruzamiento es necesaria la actividad translocasa de RuvAB para la resolución de los intermediarios de recombinación.

DISCUSSION

1. Análisis funcional de la resolvasa RecU en reparación por recombinación homóloga

1.1. Análisis de la expresión del gen de *recU*

En *B. subtilis* el gen de *recU* se encuentra formando un operón con el gen *ponA*, que codifica para la proteína PBP1 (*penicillin binding protein 1*) (Popham and Setlow 1995), que participa en la formación del septo durante la división celular. Esta organización génica se mantiene en otras bacterias del Filo Firmicutes, como es el caso de *B. anthracis*, *B. stearothermophilus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, entre otros (Kelly *et al.* 2000; Pedersen and Setlow 2000). Se ha comprobado que la inducción de la expresión de *recU* y por tanto del operón es independiente del daño en el ADN y no se induce durante la respuesta SOS, como ocurre en el caso de los genes *ruvA* y *ruvB* (Au *et al.* 2005). En cambio, la expresión de *recU* se induce por adición de vancomicina (ver Fig. 15). Esto es debido a que el operón *recU-ponA* forma parte del regulón σ^M , que se activa en situaciones de estrés sobre la membrana celular. La activación del regulón σ^M no induce la expresión de otras proteínas con excepción de DisA (Jervis *et al.* 2007; Eiamphungporn and Helmann 2008) que codifica para la proteína DisA (*"DNA integrity sacanning protein A"*), también anotada como YacK. Se ha visto que DisA, que reconoce estructuras ramificadas incluidas HJs (Witte *et al.* 2008), escanea el ADN en búsqueda de DSBs y retrasa la entrada en esporulación hasta que no se repara el daño (Berejano-Sagie *et al.*, 2006).

El operón *ruvA-ruvB*, se mantiene tanto en bacterias Gram positivas, como en Gram negativas, por lo que la función del complejo está altamente conservada (Sharples *et al.* 1999). El control de la actividad de corte de la resolvasa es importante para facilitar la reparación de daño en el ADN, mientras que se minimiza la actividad cuando no se requiere. En *E. coli*, la expresión de RuvC se mantiene en niveles bajos, con 100 moléculas de RuvC por célula (West 1997). La expresión de *ruvC* no se induce durante la respuesta SOS, pero su actividad se estimula cuando interacciona con el complejo RuvAB (Zerbib *et al.* 1998). En el caso de RecU se ha determinado que existen ~3500 moléculas por célula. Al igual que ocurre con RuvC, la actividad de RecU en procesamiento de HJs podría estar regulada postranscripcionalmente, mediada por la interacción con RuvB.

Se ha comprobado que la forma funcional de RecU que se sintetiza *in vivo* es la que corresponde con una proteína que se sintetiza a partir del primer codón de los dos posibles. RecU se puede clasificar en aquellas que tienen una región N-terminal larga (24 – 41 aa) con *B. subtilis* como el prototipo, o aquellas que tienen una región N-terminal corta (4 – 7 aa) con *Mycobacterium genitalium* como prototipo. RecU de *B. subtilis* tiene 206 aa y una región N-terminal larga flexible, mientras que RecU de *M. genitalium* tiene de 166 aa. En RecU la tétrada NRGM (residuos 30 al 33 en *B. subtilis*) está altamente conservada. En particular los residuos R y G están conservados en todas las proteínas RecU (ver Fig. 10). En ningún caso se detecta la síntesis de la forma RPU (*recombination protein U*), que se

synthetizaría a partir del segundo posible codón de inicio de la traducción (codón 33) y que carecería de la región amino terminal, incluso cuando se induce la expresión del gen en situaciones de estrés sobre la membrana celular. Se ha demostrado que RPU daría origen a una variante mutante, por lo que se descarta su existencia.

1.2. RecU está implicada en etapas tempranas de la recombinación homóloga

Se han caracterizado dos mutantes de *recU*, *recU56* y *recU71*, capaces de resolver HJs, pero que han perdido la capacidad de promover reparación del ADN por recombinación y están afectados en transformación plasmídica.

La transformación plasmídica es un proceso independiente de RuvAB y de RecA (Fernández *et al.* 1998; Kidane *et al.* 2009) y la inactivación de RecA elimina el requerimiento de RecU durante el proceso de transformación plasmídica. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que RecU actúa fuera del contexto del resolvasoma. En *B. subtilis* no son viables los dobles mutantes *ruvAB recU* o *ruvAB recG* (Sánchez *et al.*, 2005) y en *Neisseria gonorrhoeae* (bacteria transformante natural) sólo se puede construir el doble mutante *ruvAB recG* si RecA no se expresa (Sechman *et al.*, 2006). En *E. coli* los mutantes *ruvABC* o *recG* casi no tienen fenotipo y el triple mutante tiene un fenotipo menos marcado que un mutante en *recA* (Meddows *et al.*, 2004). Estos datos genéticos sugieren que la translocación y/o resolución de HJ regulan directa o indirectamente la actividad de RecA en al menos *B. subtilis* y *N. gonorrhoeae*.

Como mediador de RecA, RecU regula la formación del filamento de RecA durante la pre-sinapsis, el cual sería deletéreo durante el proceso de transformación en un fondo genético $\Delta recU$. Este resultado coincide con la observación de que tanto RecA como RecU co-localizan con la maquinaria de competencia en los polos de la célula y que en ausencia de RecA, no se forman los focos de RecU (Kidane *et al.* 2009). Esta hipótesis coincide con los resultados obtenidos *in vitro*. RecU impide la formación del filamento nucleoproteico de RecA, inhibe la actividad de intercambio de cadenas e interacciona con RecA en ausencia de ADNcs y/o dATP. Sin embargo, los mutantes RecUK56A y RecUR71A no tienen esa capacidad inhibitoria (ver Figs. 22 y 24). Por otro lado, RecUK56A y RecUR71A unen y cortan HJs, y ésta actividad se estimula por la presencia de RuvB. Todo esto indica que estos mutantes son activos en etapas tardías de la recombinación homóloga, pero nulos en etapas tempranas, ya que no ejercen un efecto negativo sobre la actividad de RecA ni interaccionan con ésta.

El homodímero de RecU presenta en su estructura dos partes bien diferenciadas, un cuerpo principal o núcleo (residuos 1-55 y 90-206), en el que se sitúa el centro catalítico de la proteína (Asp88, Asp 99 y Glu101), y un tallo, que sale del núcleo, formado por dos lazos (residuos 56 a 89) (Fig. 51). La región final de estos lazos está desordenada en la estructura de RecU de *B. subtilis* (McGregor *et al.* 2005). La estructura completa del tallo es visible en el mapa de densidad electrónica de BstRecU (PDB 1Y10). RecU de *B. subtilis* tiene un 59% de identidad de secuencia

con RecU de *B. stearothermophilus* (*Bst*RecU) y la identidad aumenta hasta el 88% en la región del tallo. En esa región se sitúan los mutantes RecUK56A y RecUR71A y ambos residuos están muy conservados en Firmicutes. El residuo R71 se encuentra alejado del centro catalítico. Sin embargo, el residuo K56 se encuentra muy próximo al residuo catalítico D88, por lo que podría además desempeñar una función en el posicionamiento del centro activo. Esto podría explicar el resultado observado en la reacción de corte de HJs llevada a cabo por este mutante, que aunque presenta la misma afinidad de unión a HJs, presenta una eficiencia de corte del 20% respecto a la proteína RecU WT (ver Fig. 21)

Estos resultados indican que RecU tiene tres actividades *in vitro*: 1) promueve el anillamiento de ADN, 2) cataliza la resolución de HJs y 3) modula la actividad de RecA. Se desconoce aún el papel *in vivo* de la actividad de anillamiento de ADN. Las dos últimas actividades, que juegan un importante papel *in vivo*, se pueden separar genéticamente.

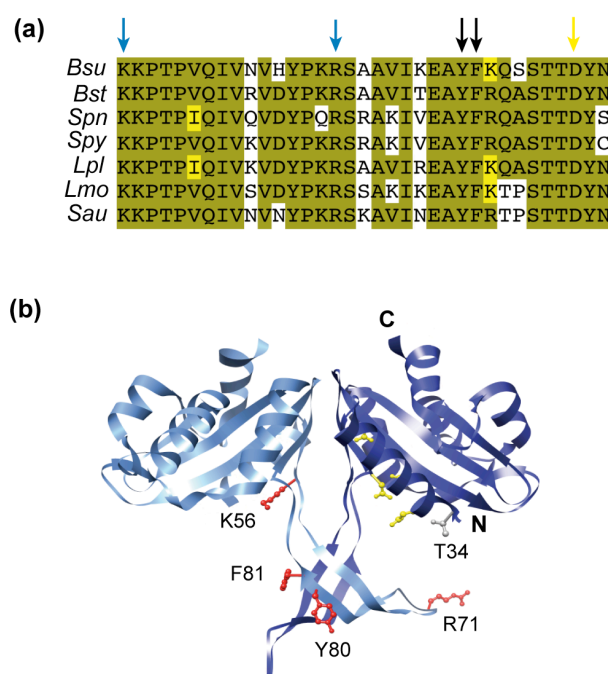


Figura 51. Residuos conservados en la región del tallo y su localización en la estructura de rayos X de *Bst*RecU. (a) Alineamiento de secuencias de la región del tallo de diferentes RecU de Firmicutes. *Bsu*, *B. subtilis*; *Bst*, *Bacillus stearothermophilus*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*; *Spy*, *Streptococcus pyogenes*; *Lpl*, *Lactobacillus plantarum*; *Lmo*, *Lysteria monocytogenes*; *Sau*, *Staphylococcus aureus*. La región del tallo en *Bsu*RecU comprende los residuos 56 al 89 (PDB: 1ZP7). Los residuos K56A y R71A se indican con flechas azules. Los residuos Y80 y F81 se indican con flechas negras. El residuo catalítico D88 se indica con flechas amarillas. Los residuos idénticos se muestran en verde y los conservados en amarillo (b) Localización de los residuos mutados en la región del tallo en la estructura de rayos X de *Bst*RecU (PDB: 1Y10). El número de residuo corresponde al de la proteína *Bsu*RecU. Los residuos de la región del tallo que han sido analizados se muestran de color rojo en uno de los monómeros. Los residuos catalíticos se muestran en amarillo en el otro monómero. En gris se muestra el primer aminoácido presente en el cristal. N y C indican respectivamente el extremo amino y carboxilo terminal.

La sensibilidad a MMS de *recU56* y *recU71* es similar a la del mutante de delección, pero ambos mutantes son capaces de resolver HJs e interaccionar con RuvB. Por lo tanto es probable que la actividad de modulación de RecA tenga un importante papel en reparación por recombinación y ésta se localiza en la región del tallo. Esto se ha confirmado posteriormente mediante el aislamiento de otros mutantes en la región del tallo, *recU80* y *recU81*, que también están implicados en la interacción con RecA (ver Fig. 34) y presentan un fenotipo sensible a MMS (ver Fig. 27).

No se ha descrito para RuvC una función similar en modulación de la actividad de RecA, pero si hay evidencias de un papel de la resolvasa Hjc de arqueas en etapas tempranas de la recombinación. Hjc, cuya estructura de rayos X es similar a RecU, interacciona con RadB, que es un mediador de RadA (homólogo de RecA en arqueas) sólo en ausencia de ATP (Komori *et al.* 2000). *BsuRecU* es capaz de interaccionar con RecA en ausencia y presencia de dATP. Por otro lado, el complejo Rad51C-XRCC3 de mamíferos está implicado en las etapas tempranas de la RH, uniendo y anillando ADN y reclutando a Rad51 (Kuznetsov *et al.* 2007) e interviniendo en la resolución de intermediarios de recombinación (Liu *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007). Por tanto, lo que parece común en todos los organismos es la existencia de una proteína que acopla la actividad de la recombinasa a la actividad de migración de ramas y resolución de la HJ. Este papel lo podría llevar a cabo RecU. Está descrito que RecA en presencia de dATP forma filamentos y RecU se une al ADNcs. Parece que RecU, una vez que interacciona con RecA, controlaría la nucleación y/o dinámica de filamentación de RecA. Posteriormente el complejo RuvAB llevaría a cabo la translocación o migración de ramas y RecU produciría la resolución de las HJs. De esta manera, los procesos de etapas tempranas y tardías de la RH se producirían de forma coordinada y rápida. Se desconoce el mecanismo molecular por el que se produce la modulación de RecU sobre RecA, pero los datos obtenidos sugieren que RecU podría modular la nucleación de RecA en el ADNcs. En el proceso de transformación RecU actúa antes que RecX, y ésta produce el desensamblaje de los filamentos de RecA (Ragone *et al.* 2008). Queda por tanto determinar el mecanismo molecular por el que RecU inhibe la acción de RecA.

1.3. La región N-terminal de RecU es esencial para la unión estable a HJs y para la interacción con RuvB

En la estructura cristalina del dímero de RecU la región amino terminal, que comprende los residuos 1-33 se encuentra desordenada. Contiene cuatro residuos conservados entre las distintas proteínas RecU, los residuos N30, R31, G32 y M33 (tétrada NRGM). Los residuos R y G de la tétrada se conservan en todas las proteínas RecU. Según el modelo propuesto de interacción de RecU con la HJ, las dos ramas que no son cortadas podrían establecer contacto con residuos localizados en esta región (ver Fig. 12). Esta hipótesis explicaría la baja estabilidad observada del complejo ADN-proteína de los mutantes *RecUΔ1-29* y *RecUΔ1-32* y por tanto el defecto en resolución de HJs. Esta interacción parece ser esencial para la función de

RecU de procesamiento de HJs, ya que la cepa mutante *recU* Δ 1-32 muestra la misma sensibilidad que la cepa $\Delta*recU* a una exposición a MMS y un defecto en segregación cromosomal, debido al alto porcentaje de células anucleadas que presenta esta cepa.$

Por otro lado, la región N-terminal podría constituir la zona de interacción con RuvB. Si RecU se une al punto de entrecruzamiento de la HJ, los anillos hexaméricos de RuvB podrían unirse a los brazos de la estructura rodeando al dsDNA a ambos lados de RecU, de una forma similar a lo que ocurre en el complejo RuvAB (Yamada *et al.* 2002; Mayanagi *et al.* 2008). El mutante de la tétrada conservada RecUR31A, une y corta HJs *in vitro* con la misma eficiencia que la proteína WT, pero a diferencia de ésta, la actividad de resolución de HJs no se ve estimulada por RuvB (ver Fig. 18). Además la interacción entre las proteínas (medida mediante entrecruzamiento con DSS) se encuentra disminuída y no se detecta un complejo RuvB-RecU-HJ en ensayos de retardo en gel (ver Fig. 45). Aunque *in vitro* el mutante RecUR31A muestre un comportamiento similar a la proteína WT en procesamiento de HJs cortas, parece que la interacción tiene un importante papel *in vivo*, debido al fenotipo sensible a MMS que presenta la cepa mutante y el alto porcentaje de células anucleadas (4%), similar al de una cepa $\Delta*recU*. Las proteínas RecU Δ 1-32 y RecU Δ 1-29 muestran una baja estabilidad del complejo ADN-proteína, que resulta finalmente en un defecto en procesamiento de HJs y por tanto en segregación cromosomal. En cambio, la capacidad de interacción con RuvB permanece inalterada en el mutante *recU* Δ 1-29. Esto indicaría que este el residuo R31 estaría implicado directamente en la interacción con RuvB. En *E. coli* también se ha descrito una interacción directa entre la resolvasa RuvC y la helicasa RuvB (Eggleston *et al.* 1997), aunque se desconocen las regiones implicadas en cada proteína. La región N-terminal de RecU se encuentra desordenada en todos los cristales de RecU, debido probablemente a su carácter flexible, por lo que resulta difícil elaborar un modelo de interacción entre RecU y RuvB. Podría ser que la región de RuvB que interacciona con RecU es la misma que interacciona con RuvA, ya que parece ser que RuvA y RecU son mutuamente excluyentes.$

1.4. La región del tallo es esencial para el reconocimiento y distorsión de las estructuras de Holliday

RecU pertenece a la superfamilia nucleasa de las resolvasas, que muestran homología estructural con las enzimas de restricción tipo II (Declais and Lilley 2008). El cuerpo principal de la proteína, que contiene el centro catalítico, es estructuralmente similar al que presentan otras resolvasas de la superfamilia, como es la resolvasa T7 Endo I (Hadden *et al.* 2007) o Hjc de arqueas (Nishino *et al.* 2001).

Discusión

En cambio, la región del tallo presente en RecU, no existe en las resolvasas de la familia(Fig. 52).

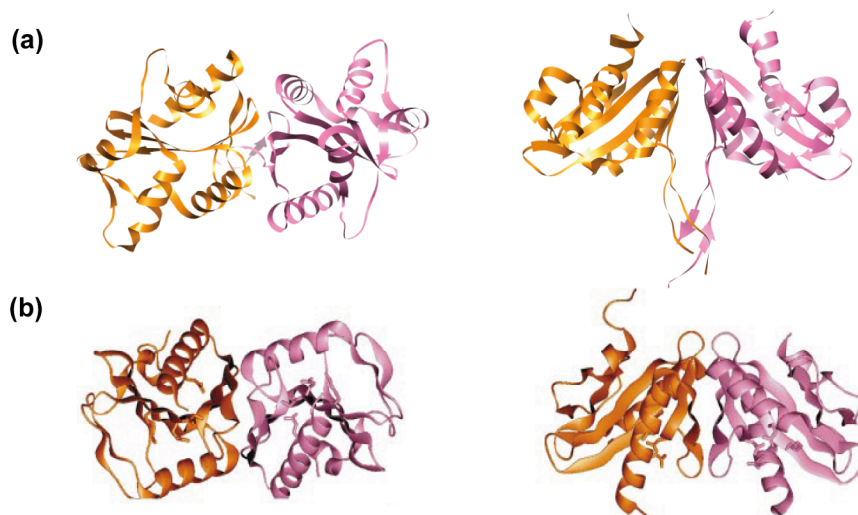


Figura 52. Comparación de estructuras entre RecU y Hjc. Se muestran dos vistas ortogonales del dímero de RecU de *B. subtilis* (PDB: 1ZP7) **(a)** y de Hjc de *Pyrococcus furiosus* (PDB: 1GEF) **(b)**. En cada dímero, un monómero se muestra de color naranja y el otro de color rosa. Adaptado de Nishino et al., 2001.

Se han descrito las estructuras de las resolvasas T7 Endo I y T4 Endo VII en complejo con la HJ (Biertumpfel *et al.* 2007; Hadden *et al.* 2007), Ambas resolvasas, que carecen de especificidad de corte, muestran que la disposición de las ramas de la HJ con estas resolvasas no es totalmente extendida, como se ha visto que ocurre en el caso del complejo RecU-HJ (McGregor *et al.* 2005). Si el modelo de interacción entre RecU y la HJ es correcto, la región del tallo se alojaría en la cavidad existente en el punto de entrecruzamiento, favoreciendo la disrupción de las bases y por tanto, la disposición abierta o extendida de la estructura. En este trabajo se ha comprobado que dos residuos aromáticos, Y80 y F81, situados en esta zona, están directamente implicados en el reconocimiento y distorsión de HJs. Estos residuos se encuentran conservados en otras proteínas RecU (Fig. 51). La sustitución de estos residuos por alanina dan lugar a variantes de RecU en las que se pierde casi o totalmente la especificidad de unión a HJs. La proteína RecU WT muestra una alta selectividad por estructuras de cuatro ramas (Ayora *et al.* 2004), pero los mutantes RecUY80A y RecUF81A han perdido esa selectividad y la afinidad de unión a HJs comparada con la afinidad a otro tipo de sustratos, no varía más de 2 a 4 veces. RecUF81A no es capaz de resolver HJs y la estabilidad de unión a HJ está reducida, mientras que RecUY80A, que une y distorsiona HJs con baja eficiencia, es capaz de

resolver HJs sólo a altas concentraciones de proteína (ver figs. 29 y 30). Las diferencias entre los dos mutantes en las actividades bioquímicas ensayadas pueden ser debido al tipo de interacciones que ambos residuos establecen con la HJ. Las tirosinas, como es Y80, tienen un fuerte carácter hidrofílico, por lo que interaccionarían con el esqueleto de fosfato. Las fenilalaninas, como es F81, debido a su carácter hidrofóbico, podría favorecer una interacción con las bases nucleotídicas. Esta interacción hidrofóbica con las bases nucleotídicas sería mas importante que la interacción hidrofílica con el esqueleto de fosfato para la correcta disposición de la HJ que permita su resolución, ya que el mutante RecUF81A es nulo en resolución de HJs y el mutante RecUY80A conserva algo de actividad (ver fig. 30).

En *EcoRuvC*, perteneciente a la superfamilia integrasa, se ha identificado un residuo, F69, que está implicado en la interacción con las bases nucleótidas y sería el responsable de un cambio conformacional de la HJ, necesario para la reacción catalítica (Yoshikawa *et al.* 2001). Se ha descrito también en otros sistemas que los residuos de fenilalanina puede ser importantes para la interacción ADN-proteína (Baker and Grant 2007). Debido a que el mutante RecUF81A aunque es capaz de llevar la HJ hacia la forma extendida, no es capaz de llevar a cabo la resolución de la misma, podría estar implicado en el correcto posicionamiento del ADN en el centro activo. No se ha descrito para otras resolvasas de la superfamilia nucleasa la existencia de interacciones entre residuos aromáticos y la HJ. En el cristal del complejo T7 Endo I-HJ, las interacciones entre la proteína y el ADN se producen mediante numerosos puentes de hidrógeno, en los que generalmente están implicados aminoácidos cargados (Hadden *et al.* 2007). En el complejo T4 Endo VII-HJ, los únicos residuos que parecen interaccionar en el punto de entrecruzamiento son aminoácidos cargados positivamente (Biertumpfel *et al.* 2007), que interaccionarían con el esqueleto de fosfato. Esto explicaría la falta de especificidad de secuencia en estas resolvasas. Además, en ambas resolvasas el complejo proteína-HJ tendría una disposición apilada, por lo que el mecanismo de unión y distorsión de la HJ que presenta RecU parece más similar al de RuvC, aún siendo de superfamilias distintas.

Ni el mutante RecUY80A ni RecUF81A son capaces de inhibir la actividad dATPasa ni la actividad de intercambio de cadenas llevada a cabo por RecA (ver fig. 34), por lo que la interacción con RecA se ha visto afectada. Este resultado coincidiría con los resultados obtenidos para los mutantes RecUK56A y RecUR71A (Fig. 51), localizados también en la región del tallo y que tampoco interaccionan con RecA.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que tanto la zona de interacción con RecA como la de interacción con la HJ, es la región del tallo. En *BsuRecU*, la actividad de modulación de RecA y la de unión y resolución de HJs son mutuamente excluyentes, puesto que una vez que RecU se encuentra unida a la HJ, no es capaz de modular la actividad de RecA y ésta no es capaz de desplazar a RecU de la HJ (ver fig. 35). No se ha analizado hasta el momento si esta exclusión de funciones ocurre en otras resolvasas de la superfamilia, como es el caso de las resolvasas de arqueas.

2. Análisis del resolvasoma en *Bacillus subtilis*

2.1. Caracterización del complejo translocasa RuvAB

En este trabajo se han purificado y se ha analizado la actividad bioquímica de las proteínas que componen el complejo translocasa de HJs de *B. subtilis*, RuvA y RuvB. Mediante ensayos de entrecruzamiento en presencia de DSS se comprobó que RuvA presenta distintos estados oligoméricos, que incluye entre otras la forma tetramérica (ver fig. 36). Se ha obtenido el cristal de otras proteínas RuvA unida a la HJ. Se visto que la proteína forma un tetrámero en *E. coli* (Rafferty *et al.* 1996), aunque también se han obtenido cristales de octámeros en *Mycobacterium leprae* (Roe *et al.* 1998). Se ha detectado también la formación de dos tipos que complejos de RuvA sobre la HJ en ensayos de retardo en gel (ver Fig. 37). En cambio en *B. subtilis*, mediante AFM sólo se ha detectado la formación de un único complejo, que posiblemente correspondería a un tetrámero (ver Fig. 39). Ya que la concentración de proteína puede ser determinante en la formación de la forma octamérica de RuvA, puede ser que sólo se visualizara un tipo de complejo en AFM debido a que no se alcanzara una concentración suficiente de proteína.

RuvB muestra una débil actividad ATPasa que se estimula en presencia de ADNcd superenrollado y RuvA (ver Fig.40). RuvB de *T. thermophilus* (*TtRuvB*) presenta una alta homología de secuencia con RuvB de *B. subtilis* (*BsRuvB*). El dominio N terminal contiene los motivos Walker A y Walker B, responsables de la actividad ATPasa. Se ha visto que ADNcd superenrollado y RuvA aumentan de forma sinérgica la actividad ATPasa de *TtRuvB* (Ohnishi *et al.* 2005). Los mismos motivos se encuentran en la secuencia de *BsRuvB*, el motivo Walker A corresponde con la secuencia consenso GLGKT y el motivo Walker B con la secuencia DEIH (ver Fig. 7).

La presencia de RuvA parece ser esencial para que tenga lugar la actividad helicasa y translocasa del complejo, puesto que RuvB sola, en las condiciones probadas no es capaz de disociar una HJ (ver Fig. 41). Este resultado diferiría del obtenido para otras proteínas RuvB, en las que se comprobó que a altas concentraciones de $Mg^{2+} \geq 15$ mM, son capaces de promover migración de ramas de intermediarios de recombinación (Tsaneva *et al.* 1992; Muller *et al.* 1993).

Se ha comprobado que RuvA y RuvB forman un complejo sobre la HJ, aunque debido a su dinamismo o inestabilidad es necesario la adición de un agente entrecruzador como es el glutaraldehído y un análogo no hidrolizable del ATP, como es el ATP γ S (ver Fig. 42). Esto también es aplicable a otros complejos RuvAB-HJ descritos con anterioridad (Parsons and West 1993; Hiom and West 1995; Han *et al.* 2001). De los ensayos realizados no es posible determinar la composición del complejo. En ese sentido, ensayos de filtración en gel en presencia de ambas proteínas y ausencia y presencia de cofactores como Mg^{2+} y ATP aportarían más información acerca de la composición del complejo. Estudios de microscopía electrónica llevados a cabo por Carlos Martín González en colaboración con el grupo de la Dra. Carmen San Martín (CNB), mostraron que RuvB forma anillos hexaméricos y heptaméricos en ausencia de ADN. Estudios más recientes han mostrado que la octamerización de RuvA es importante para que se produzca una eficiente migración de ramas en *T. thermophilus*, ya que RuvA estabilizaría la unión de RuvB

al ADN, evitando el desensamblado del complejo (Fujiwara *et al.* 2008; Mayanagi *et al.* 2008).

2.2. RuvA inhibe la reacción de corte de RecU e inhibe la estimulación que RuvB ejerce sobre RecU

En los ensayos bioquímicos realizados no ha sido posible detectar una interacción entre RuvA y RecU. Sin embargo, RuvA es capaz de inhibir la reacción de resolución de HJs de RecU (ver Fig. 47). En *E. coli*, la inhibición por parte de RuvA de la reacción de corte de RuvC, es por competición de RuvA en la unión al sustrato, debido a que RuvA tiene mayor afinidad de unión a HJs que RuvC (Whitby *et al.* 1996). Esto no parece que ocurra en el caso de RuvA y RecU, ya que se ha visto que al menos por ensayos de retardo en gel RuvA tiene una afinidad más baja que RecU (ver Figs. 18 y 37), lo que supondría un mecanismo de inhibición distinto. Se ha podido detectar un complejo entre *EcoRuvA* y *EcoRuvC* con la HJ mediante la realización de ensayos de retardo en gel (Whitby *et al.* 1996) y mediante coimmunoprecipitación (Davies and West 1998; Arenas-Licea *et al.* 2000). Se ha descrito que una modificación en el residuo G114 de *EcoRuvC* impide la formación del complejo RuvA-RuvC-HJ, lo que supone la existencia de una interacción directa entre las proteínas (Whitby *et al.* 1996). Estudios posteriores mostraron que RuvA de *Mycobacterium leprae* (*MleRuvA*) no es capaz de interaccionar con *EcoRuvC* y no inhibe la reacción de corte de HJs de *EcoRuvC*, lo que indicaría la existencia de interacciones específicas de especie (Arenas-Licea *et al.* 2000).

La actividad de resolución de HJs de RecU se estimula en presencia de RuvB (ver fig. 48). Entre ambas proteínas se ha comprobado que existe una interacción directa, que llevaría a una estabilización del complejo sobre la HJ y finalmente a una resolución simétrica de las estructuras por parte de RecU, necesaria para que se produzca la correcta segregación de las moléculas implicadas. La presencia de RuvA impide que RuvB ejerza un efecto estimulador en la actividad de corte de HJs de RecU, al menos en HJs que contienen la secuencia de reconocimiento situada en el punto de entrecruzamiento (ver fig. 49). Este resultado diferiría del obtenido en *E. coli*, en el que se mostró que el complejo RuvAB estimula la reacción de corte en HJs sintéticas que presentan la secuencia de reconocimiento de RuvC en el punto de entrecruzamiento (van Gool *et al.* 1999). Este resultado apoyaría la idea de que en *B. subtilis* no existe un complejo resolvasoma formado por las tres proteínas, sino que podría ser que el complejo RuvAB catalizara la migración de ramas y al llegar a la secuencia consenso que reconoce RecU, se disociara RuvA para que RecU produjera la resolución.

2.3. RecU y RuvB interaccionan en el punto de entrecruzamiento de la HJ

La interacción observada mediante ensayos de conjugación química con DSS entre RuvB y RecU (ver Fig. 43) se ha confirmado por AFM (ver Fig. 46). Por el contrario no se ha detectado el complejo entre RuvA y RuvB en ensayos de entrecruzamiento con DSS ni mediante AFM. En las condiciones probadas, no ha sido posible la detección de un complejo entre la resolvasa RecU y el complejo translocasa RuvAB, como se ha detectado para *E. coli* (Davies and West 1998). Aunque en este último caso la formación del complejo se detectó en presencia de una HJ. Se desconoce la estequiometría del complejo RuvB-RecU-HJ. En los ensayos de AFM se ha visto que RuvB sola se une de manera inespecífica a ADNcd, esto es, a los brazos de la estructura, pero cuando se incubaba con RecU se detectan dos tipos de complejos en el punto de entrecruzamiento, UBI y UBII, ambos claramente distintos de los que forma RecU sola. Esto podría estar indicando que RecU interacciona directamente con RuvB y la recluta al punto de entrecruzamiento. Puesto que se ha descrito para otras proteínas RuvB, que ésta puede formar tanto hexámeros como dodecámeros (Mitchell and West 1994; Stasiak *et al.* 1994), el complejo UBI podría estar compuesto por un dímero de RecU interaccionando con un hexámero de RuvB y el complejo UBII podría corresponder a un dímero de RecU interaccionando con dos hexámeros de RuvB.

2.4. Requerimiento de la actividad de migración de ramas en la resolución de HJs

Se ha visto que RuvA inhibe la reacción de corte de Hjs de RecU, e impide la estimulación que ejerce RuvB sobre RecU, probablemente porque es capaz de desplazar a RecU del complejo RuvB-RecU-HJ (ver Fig. 45), pero esto es válido cuando el sustrato de reacción es una HJ que contiene la secuencia consenso de RecU próxima al punto de entrecruzamiento. Cuando se utiliza la estructura-X como sustrato, es necesaria la presencia de RuvA para que haya una resolución total de la estructura (ver Fig. 50), puesto que ésta no contiene la secuencia consenso en el punto de entrecruzamiento. En el caso de *E. coli* se ha visto que el complejo *EcoRuvB-RuvC* puede catalizar aunque de forma limitada la migración de ramas (van Gool *et al.* 1998). Se desconoce si en *B. subtilis* RecU puede actuar como cargador de RuvB para catalizar el proceso de migración de ramas. Mediante la realización de ensayos bioquímicos específicos se podría obtener más información al respecto.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una incompatibilidad entre la actividad de RecU y RuvA, no se puede asegurar la existencia o no de un complejo RuvA-RuvB-RecU-HJ o resolvasoma. En ese sentido es necesario el uso de otro tipo de técnicas que arrojen más luz acerca de cómo se produce el proceso de resolución de HJs en presencia de las tres proteínas. La técnica de AFM asociada a fluorescencia puede ser muy útil para detectar la

presencia de proteínas en un complejo, al realizar fusiones de fluoróforos (por ejemplo Alexa) a las distintas proteínas implicadas en el posible complejo. Esta técnica se ha utilizado con éxito en diversos estudios, entre los que se incluye el estudio de la dinámica de filamentación de Rad51 (homólogo de RecA en eucariotas) (Modesti *et al.* 2007).

Se ha descrito en arqueas una interacción entre la proteína de migración de HJs en *Sulfolobus tokadaii* (StoHjm), y la resolvasa (StoHjc) (Li *et al.* 2008). StoHjm es el equivalente a Hel308 de *Pyrococcus furiosus* (Guy and Bolt 2005) y ambas son helicasas tipo RecQ. StoHjm presenta *in vitro* una actividad de regresión de horquillas similar a la que presenta RecG (Li *et al.* 2008). Ambas proteínas interactúan directamente y se ha visto que StoHjc inhibe la actividad helicasa de StoHjm. En el sistema de arqueas se propone que la resolvasa Hjc actuaría en coordinación con la helicasa Hjm/Hel308 en el procesamiento de intermediarios de recombinación generados durante la reparación de horquillas de replicación paradas. Hasta el momento no se ha descrito una proteína con actividad similar a RuvA. Recientemente se ha descrito en eucariotas un papel similar para la helicasa Hel308 (Tafel *et al.* 2011). Se ha descrito una interacción entre Hjc y PCNA (Dorazi *et al.* 2006) y también entre Hjm y PCNA (Li *et al.* 2008), por lo que existe una interacción directa entre proteínas de la fase post-sináptica de la recombinación y proteínas de replicación. Por el momento se desconoce si existe una interacción similar en *B. subtilis*, pero podría ser interesante determinar la existencia de interacciones entre RuvAB y RecU con proteínas de replicación, en particular con el factor de procesividad, que sería el equivalente a PCNA.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. En *B. subtilis* solamente se sintetiza la forma larga de RecU, anotada en la base de datos como P39792, que se sintetiza a partir del codon 1 y que corresponde con un polipéptido de 206 aminoácidos y 23,9 kDa de peso molecular.
2. La síntesis de RecU aumenta en situaciones de estrés sobre la membrana celular, pero no se induce durante la respuesta SOS, al contrario de lo que ocurre con RuvA y RuvB.
3. La región N-terminal de RecU además de ser esencial para la actividad de corte de RecU comprende la región de interacción con RuvB, donde la tétrada conservada NRGM, en particular el residuo R31 estaría directamente implicado en la interacción entre ambas proteínas.
4. La región del tallo de RecU está implicada en la interacción con RecA. RecU tiene un papel en el proceso de transformación plasmídica, durante el cual modularía la actividad de filamentación de RecA sobre el ADNcs. En ausencia de RecA, se eliminaría el requerimiento de RecU en este proceso. Esta función de RecU tiene un importante papel *in vivo*, ya que los mutantes K56 y R71 son sensibles a una exposición a daño en el ADN.
5. La región del tallo de RecU está implicada en el reconocimiento y distorsión de las HJs y por tanto es esencial para la actividad de resolución. Los residuos aromáticos Y80 y F81 estarían directamente implicados en el establecimiento de interacciones con la HJ.
6. La actividad de procesamiento de HJs y la de modulación de RecA, en las que interviene la región del tallo, son actividades excluyentes. Una vez que RecU se encuentra unida a la HJ, no puede interactuar con RecA, ni ejercer una inhibición sobre la actividad de ésta.
7. RuvA se une al centro de la HJ, formando dos tipos de complejos, que probablemente correspondan a un tetrámero y un octámero de RuvA. Se requiere la presencia de RuvA para la actividad helicasa de RuvB, si bien no se ha detectado un complejo mediante ensayos de entrecruzamiento de las proteínas con DSS.
8. RecU y RuvB interactúan *in vitro* en el punto de entrecruzamiento de la HJ, donde RuvB estimula la reacción de resolución de Hjs llevada a cabo por RecU, favoreciendo un corte simétrico de la estructura.
9. RuvA es capaz de desplazar a RecU del complejo RecU-RuvB-HJ e inhibe la reacción de corte de RecU, lo que sugeriría que en el momento de la resolución no existiría un complejo resolvasoma compuesto por las tres proteínas.

Conclusiones

10. Se requiere la actividad de migración de ramas llevada a cabo por el complejo RuvAB para que se produzca la correcta resolución de la HJ, cuando la secuencia de corte reconocida por RecU no se encuentra en el punto de entrecruzamiento.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D. E., I. R. Tsaneva and S. C. West (1994) Dissociation of RecA filaments from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 9901-5.
- Adams, D. E. and S. C. West (1995) Unwinding of closed circular DNA by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB recombination/repair proteins. *J Mol Biol.* **247**, 404-17.
- Alonso, J. C., G. Luder and R. H. Taylor (1991) Characterization of *Bacillus subtilis* recombinational pathways. *J Bacteriol.* **173**, 3977-80.
- Alonso, J. C., R. H. Taylor and G. Luder (1988) Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **170**, 3001-7.
- Anand, S. P., H. Zheng, P. R. Bianco, S. H. Leuba and S. A. Khan (2007) DNA helicase activity of PcrA is not required for the displacement of RecA protein from DNA or inhibition of RecA-mediated strand exchange. *J Bacteriol.* **189**, 4502-9.
- Arenas-Licea, J., A. J. van Gool, A. J. Keeley, A. Davies, S. C. West and I. R. Tsaneva (2000) Functional interactions of *Mycobacterium leprae* RuvA with *Escherichia coli* RuvB and RuvC on holliday junctions. *J Mol Biol.* **301**, 839-50.
- Ariyoshi, M., T. Nishino, H. Iwasaki, H. Shinagawa and K. Morikawa (2000) Crystal structure of the holliday junction DNA in complex with a single RuvA tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 8257-62.
- Ariyoshi, M., D. G. Vassilyev, H. Iwasaki, A. Fujishima, H. Shinagawa and K. Morikawa (1994) Preliminary crystallographic study of *Escherichia coli* RuvC protein. An endonuclease specific for Holliday junctions. *J Mol Biol.* **241**, 281-2.
- Atkinson, J. and P. McGlynn (2009) Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3475-92.
- Au, N., E. Kuester-Schoeck, V. Mandava, L. E. Bothwell, S. P. Canny, K. Chachu, S. A. Colavito, S. N. Fuller, E. S. Groban, L. A. Hensley, T. C. O'Brien, A. Shah, J. T. Tierney, L. L. Tomm, T. M. O'Gara, A. I. Goranov, A. D. Grossman and C. M. Lovett (2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol.* **187**, 7655-66.
- Ayora, S., B. Carrasco, E. Doncel-Perez, R. Lurz and J. C. Alonso (2004) *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 452-7.
- Ayora, S., A. Stasiak and J. C. Alonso (1999) The *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 G39P delivers and activates the G40P DNA helicase upon interacting with the G38P-bound replication origin. *J Mol Biol.* **288**, 71-85.
- Baharoglu, Z., A. S. Bradley, M. Le Masson, I. Tsaneva and B. Michel (2008) *ruvA* mutants that resolve Holliday junctions but do not reverse replication forks. *PLoS Genet.* **4**, e1000012.
- Baharoglu, Z., M. Petranovic, M. J. Flores and B. Michel (2006) RuvAB is essential for replication forks reversal in certain replication mutants. *EMBO J.* **25**, 596-604.
- Baker, C. M. and G. H. Grant (2007) Role of aromatic amino acids in protein-nucleic acid recognition. *Biopolymers.* **85**, 456-70.

- Bennett, R. J. and S. C. West (1995) Structural analysis of the RuvC-Holliday junction complex reveals an unfolded junction. *J Mol Biol.* **252**, 213-26.
- Benson, F. E., G. T. Illing, G. J. Sharples and R. G. Lloyd (1988) Nucleotide sequencing of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12 reveals a LexA regulated operon encoding two genes. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1541-9.
- Berka, R. M., J. Hahn, M. Albano, I. Draskovic, M. Persuh, X. Cui, A. Sloma, W. Widner and D. Dubnau (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol Microbiol.* **43**, 1331-45.
- Biertumpfel, C., W. Yang and D. Suck (2007) Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction. *Nature.* **449**, 616-20.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23.
- Bolt, E. L. and R. G. Lloyd (2002) Substrate specificity of RusA resolvase reveals the DNA structures targeted by RuvAB and RecG in vivo. *Mol Cell.* **10**, 187-98.
- Bott, K. F. and G. A. Wilson (1968) Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol Rev.* **32**, 370-8.
- Bradley, A. S., Z. Baharoglu, A. Niewiarowski, B. Michel and I. R. Tsaneva (2011) Formation of a stable RuvA double tetramer is required for efficient branch migration *in vitro* and for replication fork reversal *in vivo*. *J Biol Chem.*
- Canosi, U., G. Morelli and T. A. Trautner (1978) The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol Gen Genet.* **166**, 259-67.
- Carrasco, B., S. Ayora, R. Lurz and J. C. Alonso (2005) *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3942-52.
- Carrasco, B., M. C. Cozar, R. Lurz, J. C. Alonso and S. Ayora (2004) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J Bacteriol.* **186**, 5557-66.
- Carrasco, B., S. Fernandez, K. Asai, N. Ogasawara and J. C. Alonso (2002) Effect of the *recU* suppressors *sms* and *subA* on DNA repair and homologous recombination in *Bacillus subtilis*. *Mol Genet Genomics.* **266**, 899-906.
- Carrasco, B., C. Manfredi, S. Ayora and J. C. Alonso (2008) *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst).* **7**, 990-6.
- Ceglowski, P., G. Luder and J. C. Alonso (1990) Genetic analysis of *recE* activities in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* **222**, 441-5.
- Cejka, P., E. Cannavo, P. Polaczek, T. Masuda-Sasa, S. Pokharel, J. L. Campbell and S. C. Kowalczykowski (2010) DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature.* **467**, 112-6.
- Clegg, R. M., A. I. Murchie and D. M. Lilley (1993) The four-way DNA junction: a fluorescence resonance energy transfer study. *Braz J Med Biol Res.* **26**, 405-16.
- Cotta-Ramusino, C., D. Fachinetti, C. Lucca, Y. Doksani, M. Lopes, J. Sogo and M. Foiani (2005) Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell.* **17**, 153-9.

- Cox, M. M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet.* **35**, 53-82.
- Cox, M. M. (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **42**, 41-63.
- Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998) DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* **23**, 394-8.
- Cromie, G. A. and D. R. Leach (2000) Control of crossing over. *Mol Cell.* **6**, 815-26.
- Davies, A. A. and S. C. West (1998) Formation of RuvABC-Holliday junction complexes in vitro. *Curr Biol.* **8**, 725-7.
- de Vos, W. M., G. Venema, U. Canosi and T. A. Trautner (1981) Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol Gen Genet.* **181**, 424-33.
- Declais, A. C. and D. M. Lilley (2008) New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* **18**, 86-95.
- Dervyn, E., C. Suski, R. Daniel, C. Bruand, J. Chapuis, J. Errington, L. Janniere and S. D. Ehrlich (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science.* **294**, 1716-9.
- Doherty, A. J., L. C. Serpell and C. P. Ponting (1996) The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2488-97.
- Dorazi, R., J. L. Parker and M. F. White (2006) PCNA activates the Holliday junction endonuclease Hjc. *J Mol Biol.* **364**, 243-7.
- Dubnau, D. and C. Cirigliano (1973) Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: nonrequirement of deoxyribonucleic acid replication for uptake and integration of transforming deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* **113**, 1512-4.
- Duckett, D. R., A. I. Murchie, A. Bhattacharyya, R. M. Clegg, S. Diekmann, E. von Kitzing and D. M. Lilley (1993) The structure of DNA junctions and their interaction with enzymes. *Eur J Biochem.* **211**, 285-95.
- Duckett, D. R., A. I. Murchie, S. Diekmann, E. von Kitzing, B. Kemper and D. M. Lilley (1988) The structure of the Holliday junction, and its resolution. *Cell.* **55**, 79-89.
- Dunderdale, H. J., F. E. Benson, C. A. Parsons, G. J. Sharples, R. G. Lloyd and S. C. West (1991) Formation and resolution of recombination intermediates by *E. coli* RecA and RuvC proteins. *Nature.* **354**, 506-10.
- Ebenstein, Y., N. Gassman, S. Kim and S. Weiss (2009) Combining atomic force and fluorescence microscopy for analysis of quantum-dot labeled protein-DNA complexes. *J Mol Recognit.* **22**, 397-402.
- Eggleston, A. K., A. H. Mitchell and S. C. West (1997) *In vitro* reconstitution of the late steps of genetic recombination in *E. coli*. *Cell.* **89**, 607-17.
- Eggleston, A. K. and S. C. West (2000) Cleavage of holliday junctions by the *Escherichia coli* RuvABC complex. *J Biol Chem.* **275**, 26467-76.
- Eiamphungporn, W. and J. D. Helmann (2008) The *Bacillus subtilis* sigma(M) regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol Microbiol.* **67**, 830-48.

- Feldmann, H., L. Driller, B. Meier, G. Mages, J. Kellermann and E. L. Winnacker (1996) HDF2, the second subunit of the Ku homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **271**, 27765-9.
- Fernández, S., S. Ayora and J. C. Alonso (2000) *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Res Microbiol.* **151**, 481-6.
- Fernández, S., A. Sorokin and J. C. Alonso (1998) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of recU and recS mutations on DNA repair and homologous recombination. *J Bacteriol.* **180**, 3405-9.
- Forget, A. L., B. T. Bennett and K. L. Knight (2004) Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J Cell Biochem.* **93**, 429-36.
- Friedman, B. M. and R. E. Yasbin (1983) The genetics and specificity of the constitutive excision repair system of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* **190**, 481-6.
- Fujiwara, Y., K. Mayanagi and K. Morikawa (2008) Functional significance of octameric RuvA for a branch migration complex from *Thermus thermophilus*. *Biochem Biophys Res Commun.* **366**, 426-31.
- Fukui, K., N. Nakagawa, Y. Kitamura, Y. Nishida, R. Masui and S. Kuramitsu (2008) Crystal structure of MutS2 endonuclease domain and the mechanism of homologous recombination suppression. *J Biol Chem.* **283**, 33417-27.
- Gabbai, C. B. and K. J. Marians (2010) Recruitment to stalled replication forks of the PriA DNA helicase and replisome-loading activities is essential for survival. *DNA Repair (Amst).* **9**, 202-9.
- Gregg, A. V., P. McGlynn, R. P. Jaktaji and R. G. Lloyd (2002) Direct rescue of stalled DNA replication forks via the combined action of PriA and RecG helicase activities. *Mol Cell.* **9**, 241-51.
- Grove, J. I., S. R. Wood, G. S. Briggs, N. J. Oldham and R. G. Lloyd (2009) A soluble RecN homologue provides means for biochemical and genetic analysis of DNA double-strand break repair in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst).* **8**, 1434-43.
- Guy, C. P. and E. L. Bolt (2005) Archaeal Hel308 helicase targets replication forks in vivo and in vitro and unwinds lagging strands. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3678-90.
- Hadden, J. M., A. C. Declais, S. B. Carr, D. M. Lilley and S. E. Phillips (2007) The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I. *Nature.* **449**, 621-4.
- Hahn, J., B. Maier, B. J. Haijema, M. Sheetz and D. Dubnau (2005) Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **122**, 59-71.
- Han, Y. W., H. Iwasaki, T. Miyata, K. Mayanagi, K. Yamada, K. Morikawa and H. Shinagawa (2001) A unique beta-hairpin protruding from AAA+ ATPase domain of RuvB motor protein is involved in the interaction with RuvA DNA recognition protein for branch migration of Holliday junctions. *J Biol Chem.* **276**, 35024-8.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-80.

- Handa, N., K. Morimatsu, S. T. Lovett and S. C. Kowalczykowski (2009) Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev.* **23**, 1234-45.
- Hargreaves, D., D. W. Rice, S. E. Sedelnikova, P. J. Artymiuk, R. G. Lloyd and J. B. Rafferty (1998) Crystal structure of *E. coli* RuvA with bound DNA Holliday junction at 6 Å resolution. *Nat Struct Biol.* **5**, 441-6.
- Hiom, K., I. R. Tsaneva and S. C. West (1996) The directionality of RuvAB-mediated branch migration: in vitro studies with three-armed junctions. *Genes Cells.* **1**, 443-51.
- Hiom, K. and S. C. West (1995) Branch migration during homologous recombination: assembly of a RuvAB-Holliday junction complex in vitro. *Cell.* **80**, 787-93.
- Hishida, T., H. Iwasaki, K. Ishioka and H. Shinagawa (1996) Molecular analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes, *ruvA*, *ruvB* and *ruvC*, involved in processing of homologous recombination intermediates. *Gene.* **182**, 63-70.
- Hishida, T., H. Iwasaki, T. Yagi and H. Shinagawa (1999) Role of walker motif A of RuvB protein in promoting branch migration of holliday junctions. Walker motif a mutations affect ATP binding, Atp hydrolyzing, and DNA binding activities of RuvB. *J Biol Chem.* **274**, 25335-42.
- Holliday, R. (1967) Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of *Ustilago*. *Mutat Res.* **4**, 275-88.
- Ingleston, S. M., M. J. Dickman, J. A. Grasby, D. P. Hornby, G. J. Sharples and R. G. Lloyd (2002) Holliday junction binding and processing by the RuvA protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Eur J Biochem.* **269**, 1525-33.
- Ingleston, S. M., G. J. Sharples and R. G. Lloyd (2000) The acidic pin of RuvA modulates Holliday junction binding and processing by the RuvABC resolvosome. *EMBO J.* **19**, 6266-74.
- Ivancic-Bace, I., P. Peharec, S. Moslavac, N. Skrobot, E. Salaj-Smic and K. Brcic-Kostic (2003) RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient *recB* mutant of *Escherichia coli*. *Genetics.* **163**, 485-94.
- Iwasaki, H., Y. W. Han, T. Okamoto, T. Ohnishi, M. Yoshikawa, K. Yamada, H. Toh, H. Daiyasu, T. Ogura and H. Shinagawa (2000) Mutational analysis of the functional motifs of RuvB, an AAA+ class helicase and motor protein for holliday junction branch migration. *Mol Microbiol.* **36**, 528-38.
- Iwasaki, H., M. Takahagi, A. Nakata and H. Shinagawa (1992) *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins specifically interact with Holliday junctions and promote branch migration. *Genes Dev.* **6**, 2214-20.
- Iwasaki, H., M. Takahagi, T. Shiba, A. Nakata and H. Shinagawa (1991) *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *EMBO J.* **10**, 4381-9.
- Jervis, A. J., P. D. Thackray, C. W. Houston, M. J. Horsburgh and A. Moir (2007) SigM-responsive genes of *Bacillus subtilis* and their promoters. *J Bacteriol.* **189**, 4534-8.
- Kelly, S. J., J. Li, P. Setlow and M. J. Jedrzejas (2007) Structure, flexibility, and mechanism of the *Bacillus stearothermophilus* RecU Holliday junction resolvase. *Proteins.* **68**, 961-71.

- Kelly, S. J., R. A. Stein, I. Bagyan, P. Setlow and M. J. Jedrzejewski (2000) Structural characterization of penicillin-binding protein-related factor A (PrfA) from *Bacillus species*. *J Struct Biol.* **131**, 90-5.
- Kidane, D., B. Carrasco, C. Manfredi, K. Rothmaier, S. Ayora, S. Tadesse, J. C. Alonso and P. L. Graumann (2009) Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS Genet.* **5**, e1000630.
- Kidane, D. and P. L. Graumann (2005a) Dynamic formation of RecA filaments at DNA double strand break repair centers in live cells. *J Cell Biol.* **170**, 357-66.
- Kidane, D. and P. L. Graumann (2005b) Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell.* **122**, 73-84.
- Kidane, D., H. Sanchez, J. C. Alonso and P. L. Graumann (2004) Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Mol Microbiol.* **52**, 1627-39.
- Komori, K., T. Miyata, J. DiRuggiero, R. Holley-Shanks, I. Hayashi, I. K. Cann, K. Mayanagi, H. Shinagawa and Y. Ishino (2000) Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem.* **275**, 33782-90.
- Komori, K., S. Sakae, H. Shinagawa, K. Morikawa and Y. Ishino (1999) A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 8873-8.
- Kosa, J. L., Z. Z. Zdraveski, S. Currier, M. G. Marinus and J. M. Essigmann (2004) RecN and RecG are required for *Escherichia coli* survival of Bleomycin-induced damage. *Mutat Res.* **554**, 149-57.
- Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder and W. M. Rehrauer (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **58**, 401-65.
- Krishnamurthy, M., S. Tadesse, K. Rothmaier and P. L. Graumann (2010) A novel SMC-like protein, SbcE (YhaN), is involved in DNA double-strand break repair and competence in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **38**, 455-66.
- Kurumizaka, H., S. Ikawa, M. Nakada, K. Eda, W. Kagawa, M. Takata, S. Takeda, S. Yokoyama and T. Shibata (2001) Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3.Rad51C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 5538-43.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 751-813, table of contents.
- Kuznetsov, S., M. Pellegrini, K. Shuda, O. Fernandez-Capetillo, Y. Liu, B. K. Martin, S. Burkett, E. Southon, D. Pati, L. Tessarollo, S. C. West, P. J. Donovan, A. Nussenzweig and S. K. Sharan (2007) RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol.* **176**, 581-92.
- Kvaratskhelia, M. and M. F. White (2000a) An archaeal Holliday junction resolving enzyme from *Sulfolobus solfataricus* exhibits unique properties. *J Mol Biol.* **295**, 193-202.

- Kvaratskhelia, M. and M. F. White (2000b) Two Holliday junction resolving enzymes in *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol.* **297**, 923-32.
- Le Masson, M., Z. Baharoglu and B. Michel (2008) *ruvA* and *ruvB* mutants specifically impaired for replication fork reversal. *Mol Microbiol.* **70**, 537-48.
- Lecointe, F., C. Serena, M. Velten, A. Costes, S. McGovern, J. C. Meile, J. Errington, S. D. Ehrlich, P. Noirot and P. Polard (2007) Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *EMBO J.* **26**, 4239-51.
- Li, Z., S. Lu, G. Hou, X. Ma, D. Sheng, J. Ni and Y. Shen (2008) Hjm/Hel308A DNA helicase from *Sulfolobus tokodaii* promotes replication fork regression and interacts with Hjc endonuclease in vitro. *J Bacteriol.* **190**, 3006-17.
- Lilley, D. M. and R. M. Clegg (1993a) The structure of branched DNA species. *Q Rev Biophys.* **26**, 131-75.
- Lilley, D. M. and R. M. Clegg (1993b) The structure of the four-way junction in DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **22**, 299-328.
- Lilley, D. M. and M. F. White (2000) Resolving the relationships of resolving enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 9351-3.
- Liu, Y., J. Y. Masson, R. Shah, P. O'Regan and S. C. West (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science.* **303**, 243-6.
- Liu, Y., M. Tarsounas, P. O'Regan and S. C. West (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem.* **282**, 1973-9.
- López, C. R., S. Yang, R. W. Deibler, S. A. Ray, J. M. Pennington, R. J. Digate, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg and E. L. Zechiedrich (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol.* **58**, 80-101.
- Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev.* **58**, 563-602.
- Lusetti, S. L. and M. M. Cox (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem.* **71**, 71-100.
- Lusetti, S. L., M. D. Hobbs, E. A. Stohl, S. Chittani-Pattu, R. B. Inman, H. S. Seifert and M. M. Cox (2006) The RecF protein antagonizes RecX function via direct interaction. *Mol Cell.* **21**, 41-50.
- Lloyd, R. G., F. E. Benson and C. E. Shurvinton (1984) Effect of *ruv* mutations on recombination and DNA repair in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* **194**, 303-9.
- Lloyd, R. G. and G. J. Sharples (1993) Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1719-25.
- Mahdi, A. A., G. J. Sharples, T. N. Mandal and R. G. Lloyd (1996) Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. *J Mol Biol.* **257**, 561-73.
- Mandal, T. N., A. A. Mahdi, G. J. Sharples and R. G. Lloyd (1993) Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol.* **175**, 4325-34.

- Manfredi, C., B. Carrasco, S. Ayora and J. C. Alonso (2008) *Bacillus subtilis* RecO nucleates RecA onto SsbA-coated single-stranded DNA. *J Biol Chem.* **283**, 24837-47.
- Manfredi, C., Y. Suzuki, T. Yadav, K. Takeyasu and J. C. Alonso (2010) RecO-mediated DNA homology search and annealing is facilitated by SsbA. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6920-9.
- Manolis, K. G., E. R. Nimmo, E. Hartsuiker, A. M. Carr, P. A. Jeggo and R. C. Allshire (2001) Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **20**, 210-21.
- Mascarenhas, J., H. Sanchez, S. Tadesse, D. Kidane, M. Krisnamurthy, J. C. Alonso and P. L. Graumann (2006) *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC Mol Biol.* **7**, 20.
- Matias, P. M., S. Gorynia, P. Donner and M. A. Carrondo (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem.* **281**, 38918-29.
- Mayanagi, K., Y. Fujiwara, T. Miyata and K. Morikawa (2008) Electron microscopic single particle analysis of a tetrameric RuvA/RuvB/Holliday junction DNA complex. *Biochem Biophys Res Commun.* **365**, 273-8.
- McCulloch, R., L. W. Coggins, S. D. Colloms and D. J. Sherratt (1994) Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions *in vivo*. *EMBO J.* **13**, 1844-55.
- McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell.* **101**, 35-45.
- McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2001a) Action of RuvAB at replication fork structures. *J Biol Chem.* **276**, 41938-44.
- McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2001b) Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 8227-34.
- McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 859-70.
- McGlynn, P., A. A. Mahdi and R. G. Lloyd (2000) Characterisation of the catalytically active form of RecG helicase. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2324-32.
- McGregor, N., S. Ayora, S. Sedelnikova, B. Carrasco, J. C. Alonso, P. Thaw and J. Rafferty (2005) The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure.* **13**, 1341-51.
- Meddows, T. R., A. P. Savory and R. G. Lloyd (2004) RecG helicase promotes DNA double-strand break repair. *Mol Microbiol.* **52**, 119-32.
- Menetski, J. P. and S. C. Kowalczykowski (1989) Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by dATP. *Biochemistry.* **28**, 5871-81.
- Michel, B., S. D. Ehrlich and M. Uzest (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* **16**, 430-8.
- Michel, B., M. J. Flores, E. Viguera, G. Grompone, M. Seigneur and V. Bidnenko (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 8181-8.

- Michel, B., G. Grompone, M. J. Flores and V. Bidnenko (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 12783-8.
- Mitchell, A. H. and S. C. West (1994) Hexameric rings of *Escherichia coli* RuvB protein. Cooperative assembly, processivity and ATPase activity. *J Mol Biol.* **243**, 208-15.
- Mitchell, A. H. and S. C. West (1996) Role of RuvA in branch migration reactions catalyzed by the RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **271**, 19497-502.
- Modesti, M., D. Ristic, T. van der Heijden, C. Dekker, J. van Mameren, E. J. Peterman, G. J. Wuite, R. Kanaar and C. Wyman (2007) Fluorescent human RAD51 reveals multiple nucleation sites and filament segments tightly associated along a single DNA molecule. *Structure.* **15**, 599-609.
- Morgan, K., J. M. Lilley, T. Arie, E. J. Byrne, R. Jones and J. Waite (1993) Incidence of dementia in a representative British sample. *Br J Psychiatry.* **163**, 467-70.
- Morimatsu, K. and S. C. Kowalczykowski (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell.* **11**, 1337-47.
- Muller, B., I. R. Tsaneva and S. C. West (1993) Branch migration of Holliday junctions promoted by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins. II. Interaction of RuvB with DNA. *J Biol Chem.* **268**, 17185-9.
- Muller, B. and S. C. West (1994) Processing of Holliday junctions by the *Escherichia coli* RuvA, RuvB, RuvC and RecG proteins. *Experientia.* **50**, 216-22.
- Nishino, T., M. Ariyoshi, H. Iwasaki, H. Shinagawa and K. Morikawa (1998) Functional analyses of the domain structure in the Holliday junction binding protein RuvA. *Structure.* **6**, 11-21.
- Nishino, T., H. Iwasaki, M. Kataoka, M. Ariyoshi, T. Fujita, H. Shinagawa and K. Morikawa (2000) Modulation of RuvB function by the mobile domain III of the Holliday junction recognition protein RuvA. *J Mol Biol.* **298**, 407-16.
- Nishino, T., K. Komori, Y. Ishino and K. Morikawa (2001a) Dissection of the regional roles of the archaeal Holliday junction resolvase Hjc by structural and mutational analyses. *J Biol Chem.* **276**, 35735-40.
- Nishino, T., K. Komori, D. Tsuchiya, Y. Ishino and K. Morikawa (2001b) Crystal structure of the archaeal holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition. *Structure.* **9**, 197-204.
- Niu, H., W. H. Chung, Z. Zhu, Y. Kwon, W. Zhao, P. Chi, R. Prakash, C. Seong, D. Liu, L. Lu, G. Ira and P. Sung (2010) Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* **467**, 108-11.
- Ohnishi, T., T. Hishida, Y. Harada, H. Iwasaki and H. Shinagawa (2005) Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J Biol Chem.* **280**, 30504-10.
- Ohnishi, T., H. Iwasaki, Y. Ishino, S. Kuramitsu, A. Nakata and H. Shinagawa (2000) Identification and characterization of *Thermus thermophilus* HB8 RuvA protein, the subunit of the RuvAB protein complex that promotes branch migration of Holliday junctions. *Genes Genet Syst.* **75**, 233-43.

- Paques, F. and J. E. Haber (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 349-404.
- Parsons, C. A., I. Tsaneva, R. G. Lloyd and S. C. West (1992) Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 5452-6.
- Parsons, C. A. and S. C. West (1993) Formation of a RuvAB-Holliday junction complex in vitro. *J Mol Biol.* **232**, 397-405.
- Pastink, A. and P. H. Lohman (1999) Repair and consequences of double-strand breaks in DNA. *Mutat Res.* **428**, 141-56.
- Pedersen, L. B. and P. Setlow (2000) Penicillin-binding protein-related factor A is required for proper chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **182**, 1650-8.
- Petrova, V., S. Chitteni-Pattu, J. C. Drees, R. B. Inman and M. M. Cox (2009) An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Mol Cell.* **36**, 121-30.
- Polard, P., S. Marsin, S. McGovern, M. Velten, D. B. Wigley, S. D. Ehrlich and C. Bruand (2002) Restart of DNA replication in Gram-positive bacteria: functional characterisation of the *Bacillus subtilis* PriA initiator. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1593-605.
- Popham, D. L. and P. Setlow (1995) Cloning, nucleotide sequence, and mutagenesis of the *Bacillus subtilis* ponA operon, which codes for penicillin-binding protein (PBP) 1 and a PBP-related factor. *J Bacteriol.* **177**, 326-35.
- Putnam, C. D., S. B. Clancy, H. Tsuruta, S. Gonzalez, J. G. Wetmur and J. A. Tainer (2001) Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol.* **311**, 297-310.
- Radovic, S., V. A. Rapisarda, V. Tosato and C. V. Bruschi (2007) Functional and comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RVB1 and RVB2 genes with bacterial Ruv homologues. *FEMS Yeast Res.* **7**, 527-39.
- Rafferty, J. B., S. M. Ingleston, D. Hargreaves, P. J. Artymiuk, G. J. Sharples, R. G. Lloyd and D. W. Rice (1998) Structural similarities between *Escherichia coli* RuvA protein and other DNA-binding proteins and a mutational analysis of its binding to the holliday junction. *J Mol Biol.* **278**, 105-16.
- Rafferty, J. B., S. E. Sedelnikova, D. Hargreaves, P. J. Artymiuk, P. J. Baker, G. J. Sharples, A. A. Mahdi, R. G. Lloyd and D. W. Rice (1996) Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science.* **274**, 415-21.
- Ragone, S., J. D. Maman, N. Furnham and L. Pellegrini (2008) Structural basis for inhibition of homologous recombination by the RecX protein. *EMBO J.* **27**, 2259-69.
- Roe, S. M., T. Barlow, T. Brown, M. Oram, A. Keeley, I. R. Tsaneva and L. H. Pearl (1998) Crystal structure of an octameric RuvA-Holliday junction complex. *Mol Cell.* **2**, 361-72.
- Rudolph, C. J., A. L. Upton, G. S. Briggs and R. G. Lloyd (2010) Is RecG a general guardian of the bacterial genome? *DNA Repair (Amst).* **9**, 210-23.

- Saito, A., H. Iwasaki, M. Ariyoshi, K. Morikawa and H. Shinagawa (1995) Identification of four acidic amino acids that constitute the catalytic center of the RuvC Holliday junction resolvase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 7470-4.
- San Filippo, J., P. Sung and H. Klein (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* **77**, 229-57.
- Sánchez, H., P. P. Cardenas, S. H. Yoshimura, K. Takeyasu and J. C. Alonso (2008) Dynamic structures of *Bacillus subtilis* RecN-DNA complexes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 110-20.
- Sánchez, H., B. Carrasco, M. C. Cozar and J. C. Alonso (2007) *Bacillus subtilis* RecG branch migration translocase is required for DNA repair and chromosomal segregation. *Mol Microbiol.* **65**, 920-35.
- Sánchez, H., D. Kidane, M. Castillo Cozar, P. L. Graumann and J. C. Alonso (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J Bacteriol.* **188**, 353-60.
- Sánchez, H., D. Kidane, P. Reed, F. A. Curtis, M. C. Cozar, P. L. Graumann, G. J. Sharples and J. C. Alonso (2005) The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics.* **171**, 873-83.
- Sanders, G. M., H. G. Dallmann and C. S. McHenry (2010) Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Mol Cell.* **37**, 273-81.
- Sechman, E. V., K. A. Kline and H. S. Seifert (2006) Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. *Mol Microbiol.* **61**, 185-93.
- Seigneur, M., V. Bidnenko, S. D. Ehrlich and B. Michel (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell.* **95**, 419-30.
- Seigneur, M., S. D. Ehrlich and B. Michel (2000) RuvABC-dependent double-strand breaks in dnaBts mutants require recA. *Mol Microbiol.* **38**, 565-74.
- Shah, R., R. Cosstick and S. C. West (1997) The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *EMBO J.* **16**, 1464-72.
- Sharples, G. J. (2001) The X philes: structure-specific endonucleases that resolve Holliday junctions. *Mol Microbiol.* **39**, 823-34.
- Sharples, G. J., F. E. Benson, G. T. Illing and R. G. Lloyd (1990) Molecular and functional analysis of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12 reveals three genes involved in DNA repair and recombination. *Mol Gen Genet.* **221**, 219-26.
- Sharples, G. J., S. M. Ingleston and R. G. Lloyd (1999) Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RuvA. *J Bacteriol.* **181**, 5543-50.
- Sharples, G. J. and R. G. Lloyd (1991) Resolution of Holliday junctions in *Escherichia coli*: identification of the *ruvC* gene product as a 19-kilodalton protein. *J Bacteriol.* **173**, 7711-5.
- Sherratt, D. J. (2003) Bacterial chromosome dynamics. *Science.* **301**, 780-5.
- Shurvinton, C. E. and R. G. Lloyd (1982) Damage to DNA induces expression of the *ruv* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **185**, 352-5.

- Sluijter, M., E. Kaptein, E. B. Spuesens, T. Hoogenboezem, N. G. Hartwig, A. M. Van Rossum and C. Vink (2010) The *Mycoplasma genitalium* MG352-encoded protein is a Holliday junction resolvase that has a non-functional orthologue in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **77**, 1261-77.
- Stasiak, A., I. R. Tsaneva, S. C. West, C. J. Benson, X. Yu and E. H. Egelman (1994) The *Escherichia coli* RuvB branch migration protein forms double hexameric rings around DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 7618-22.
- Stragier, P., C. Bonamy and C. Karmazyn-Campelli (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell.* **52**, 697-704.
- Tafel, A. A., L. Wu and P. J. McHugh (2011) Human HEL308 Localizes to Damaged Replication Forks and Unwinds Lagging Strand Structures. *J Biol Chem.* **286**, 15832-40.
- Takahagi, M., H. Iwasaki, A. Nakata and H. Shinagawa (1991) Molecular analysis of the *Escherichia coli* *ruvC* gene, which encodes a Holliday junction-specific endonuclease. *J Bacteriol.* **173**, 5747-53.
- Tsaneva, I. R., B. Muller and S. C. West (1992) ATP-dependent branch migration of Holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. *Cell.* **69**, 1171-80.
- Tsaneva, I. R., B. Muller and S. C. West (1993) RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 1315-9.
- Tsuda, M., R. W. Kozak, C. K. Goldman and T. A. Waldmann (1987) Contribution of a p75 interleukin 2 binding peptide to a high-affinity interleukin 2 receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 4215-8.
- van Gool, A. J., N. M. Hajibagheri, A. Stasiak and S. C. West (1999) Assembly of the *Escherichia coli* RuvABC resolvosome directs the orientation of holliday junction resolution. *Genes Dev.* **13**, 1861-70.
- van Gool, A. J., R. Shah, C. Mezard and S. C. West (1998) Functional interactions between the holliday junction resolvase and the branch migration motor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**, 1838-45.
- Velten, M., S. McGovern, S. Marsin, S. D. Ehrlich, P. Noirot and P. Polard (2003) A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell.* **11**, 1009-20.
- Vora, A. J. and J. S. Lilleyman (1993) Wolfram syndrome: mitochondrial disorder. *Lancet.* **342**, 1059.
- Weller, G. R., B. Kysela, R. Roy, L. M. Tonkin, E. Scanlan, M. Della, S. K. Devine, J. P. Day, A. Wilkinson, F. d'Adda di Fagagna, K. M. Devine, R. P. Bowater, P. A. Jeggo, S. P. Jackson and A. J. Doherty (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science.* **297**, 1686-9.
- Wen, Q., A. A. Mahdi, G. S. Briggs, G. J. Sharples and R. G. Lloyd (2005) Conservation of RecG activity from pathogens to hyperthermophiles. *DNA Repair (Amst).* **4**, 23-31.
- West, S. C. (1994) Processing of Holliday junctions by RuvABC--an overview. *Ann N Y Acad Sci.* **726**, 156-63; discussion 163-4.

- West, S. C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet.* **31**, 213-44.
- West, S. C., I. R. Tsaneva, K. Hiom and F. E. Benson (1993) Late steps in genetic recombination: branch migration and Holliday junction resolution by RuvA, RuvB, and RuvC proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **58**, 525-31.
- Whitby, M. C., E. L. Bolt, S. N. Chan and R. G. Lloyd (1996) Interactions between RuvA and RuvC at Holliday junctions: inhibition of junction cleavage and formation of a RuvA-RuvC-DNA complex. *J Mol Biol.* **264**, 878-90.
- White, M. F., M. J. Giraud-Panis, J. R. Pohler and D. M. Lilley (1997) Recognition and manipulation of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *J Mol Biol.* **269**, 647-64.
- Wilson, G. A. and K. F. Bott (1968) Nutritional factors influencing the development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *J Bacteriol.* **95**, 1439-49.
- Wu, L., J. K. Karow and I. D. Hickson (1999) Genetic recombination: Helicases and topoisomerases link up. *Curr Biol.* **9**, R518-20.
- Yamada, K., N. Kunishima, K. Mayanagi, T. Ohnishi, T. Nishino, H. Iwasaki, H. Shinagawa and K. Morikawa (2001) Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 1442-7.
- Yamada, K., T. Miyata, D. Tsuchiya, T. Oyama, Y. Fujiwara, T. Ohnishi, H. Iwasaki, H. Shinagawa, M. Ariyoshi, K. Mayanagi and K. Morikawa (2002) Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol Cell.* **10**, 671-81.
- Yasbin, R. E., D. L. Cheo and K. W. Bayles (1992) Inducible DNA repair and differentiation in *Bacillus subtilis*: interactions between global regulons. *Mol Microbiol.* **6**, 1263-70.
- Yasbin, R. E., P. I. Fields and B. J. Andersen (1980) Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed of their natural prophages. *Gene.* **12**, 155-9.
- Yasbin, R. E. and R. Miehle (1980) Deoxyribonucleic Acid Repair in *Bacillus subtilis*: Development of Competent Cells into a Tester for Carcinogens. *Appl Environ Microbiol.* **39**, 854-8.
- Yeeles, J. T. and M. S. Dillingham (2010) The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes. *DNA Repair (Amst).* **9**, 276-85.
- Yoshikawa, M., H. Iwasaki, K. Kinoshita and H. Shinagawa (2000) Two basic residues, Lys-107 and Lys-118, of RuvC resolvase are involved in critical contacts with the Holliday junction for its resolution. *Genes Cells.* **5**, 803-13.
- Yoshikawa, M., H. Iwasaki and H. Shinagawa (2001) Evidence that phenylalanine 69 in *Escherichia coli* RuvC resolvase forms a stacking interaction during binding and destabilization of a Holliday junction DNA substrate. *J Biol Chem.* **276**, 10432-6.
- Yu, X., M. J. Jezewska, W. Bujalowski and E. H. Egelman (1996) The hexameric *E. coli* DnaB helicase can exist in different Quaternary states. *J Mol Biol.* **259**, 7-14.
- Yu, X., S. C. West and E. H. Egelman (1997) Structure and subunit composition of the RuvAB-Holliday junction complex. *J Mol Biol.* **266**, 217-22.

Bibliografia

- Zerbib, D., S. D. Colloms, D. J. Sherratt and S. C. West (1997) Effect of DNA topology on Holliday junction resolution by *Escherichia coli* RuvC and bacteriophage T7 endonuclease I. *J Mol Biol.* **270**, 663-73.
- Zerbib, D., C. Mezard, H. George and S. C. West (1998) Coordinated actions of RuvABC in Holliday junction processing. *J Mol Biol.* **281**, 621-30.

ANEXOS

The RecU Holliday junction resolvase acts at early stages of homologous recombination

Cristina Cañas, Begoña Carrasco, Silvia Ayora* and Juan C. Alonso

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, C/Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Received June 20, 2008; Revised and Accepted July 18, 2008

ABSTRACT

Homologous recombination is essential for DNA repair and generation of genetic diversity in all organisms. It occurs through a series of presynaptic steps where the substrate is presented to the recombinase (RecA in bacteria). Then, the recombinase nucleoprotein filament mediates synapsis by first promoting the formation of a D-loop and later of a Holliday junction (HJ) that is subsequently cleaved by the HJ resolvase. The coordination of the synaptic step with the late resolution step is poorly understood. *Bacillus subtilis* RecU catalyzes resolution of HJs, and biochemical evidence suggests that it might modulate RecA. We report here the isolation and characterization of two mutants of RecU (*recU56* and *recU71*), which promote resolution of HJs, but do not promote RecA modulation. *In vitro*, the RecU mutant proteins (RecUK56A or RecUR71A) bind and cleave HJs and interact with RuvB. RecU interacts with RecA and inhibits its single-stranded DNA-dependent dATP hydrolysis, but RecUK56A and RecUR71A do not exert a negative effect on the RecA dATPase and fail to interact with it. Both activities are important *in vivo* since RecU mutants impaired only in RecA interaction are as sensitive to DNA damaging agents as a deletion mutant.

INTRODUCTION

All cells have evolved efficient mechanisms to promote genetic diversity, ensure proper chromosome segregation and restore genome integrity via homologous recombination (HR) (1,2). In bacteria, alternative avenues process the free duplex DNA end(s) at double-strand (ds) breaks and several modulators can recruit RecA onto the 3' single-stranded (ss) DNA tailed duplex DNA (3,4–7). Then, the RecA nucleoprotein filaments search for homology and mediate invasion onto the homologous dsDNA region to form a three-strand intermediate

(D-loop structure). The unidirectional movement of the strand transfer produces a Holliday junction (HJ) that is processed by the branch migration translocases, RuvAB or RecG (4,8–11). Finally, HJs are resolved by the HJ resolvase (*Escherichia coli* RuvC or *Bacillus subtilis* RecU) with a bias towards noncrossover products, which in circular genomes result in two monomeric chromosomes (12–14). Mutations in *B. subtilis* *ruvA*, *ruvB*, *recU* or *recG* genes lead to an 80- to 150-fold increase in anucleate cells in the absence of any externally added DNA damaging agent (11,14), suggesting that proper resolution of frequently formed HJs is essential for faithful segregation of chromosomes (note that unless stated otherwise, the indicated genes and products are of *B. subtilis* origin).

In bacteria, it is generally believed that strand exchange and resolution of HJs are two separated events. However, recent studies revealed that the RecU HJ resolvase, which is present in all Firmicutes, might also act early in HR. *In vitro*, RecU enhanced RecA loading onto ssDNA and stimulated RecA-catalyzed D-loop formation, yet inhibited ssDNA-dependent dATP or rATP hydrolysis and RecA-mediated DNA strand exchange (15). Is the involvement of a HJ resolvase at early stages of HR a unique phenomenon associated with the RecU resolvase? This has not been reported for other bacteria yet, but evidences exist in archaea and mammals. *Pyrococcus furiosus* RadB, which is a RadA paralog, interacts *in vitro* with RadA and the Hjc resolvase, and regulates the cleavage of HJs by Hjc (16). A pre- and postsynaptic role for some mammalian Rad51 orthologs has also been described (17–23). As an example, the Rad51C-Xrcc3 (CX3) complex is involved in the early stages of recombination by binding DNA, catalyzing DNA pairing and recruiting Rad51 onto RPA-coated ssDNA (17–20,22,24). On the other hand, the CX3 complex may play an essential role in the resolution of HJs, hence, it can also be associated with the late stages of HR (19,21,23).

Natural transformation, which is a genetically programmed mechanism for horizontal gene transfer in bacteria, provides a means to characterize RecA-dependent and RecA-independent pathways, and is another avenue to unravel the role of RecU. If taken up ssDNA shares

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 915855450; Fax: +34 915854506; Email: sayora@cnb.csic.es

homology with recipient dsDNA, it recombines in a RecA-dependent process (e.g. chromosomal transformation) (25,26). However, the role of RecU in transformation does not seem to be the cleavage of HJs, because the entering ssDNA should form a D-loop rather than a HJ intermediate, and RecU is not able to cleave D-loop structures (15). During natural plasmid transformation, if it shares no significant homology with recipient DNA, the internalized plasmid ssDNA is channelled into a RecA-independent yet RecU- and RecO-dependent pathway(s) (27–30). To gain insight into the mechanisms that couple early and late stages of HR in Firmicutes, and to further investigate the role of RecU in early stages of recombination, we searched for *recU* mutants proficient in chromosomal segregation (HJ resolution with a bias towards noncrossover products), while deficient in plasmid transformation, and studied their action. We report the isolation and characterization of two *recU* single mutants capable of promoting resolution of HJs and segregating chromosomes properly (late stage), but which have lost the capacity to modulate RecA activities and are impaired in plasmid transformation (early stage). In this study, we provide the first evidence that both RecU activities, which are essential for recombinational repair, can be genetically separated.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids

Escherichia coli strains BL21(DE3)[pLysS] and XL1-Blue were used (31). *Bacillus subtilis* BG214 and its isogenic derivatives are listed in Supplementary Table S1. pCB568-borne *recU*, pCB697-borne *recU56* and pCB695-borne *recU71* gene, under the control of a T7 promoter, were used to over-express RecU, RecUK56A and RecU R71A proteins in BL21(DE3)[pLysS] cells, respectively. pBT61-borne *recA* gene was used to over-express RecA. A plasmid-borne *ruvB* gene with six His codons at the C-terminal end was constructed (pCB737). pCB737-borne *ruvB*-His fully complemented the Δ *ruvB* strain (data not shown), and the purified protein is therefore termed here as RuvB. pGEM-3Zf(+) is the source of circular ssDNA and linear dsDNA (Promega, Madison, WI, USA).

Protein purification

RecA was purified from BG214 cells (15) and RecU, RecUK56A and RecUR71A proteins were purified from BL21(DE3)[pLysS] cells, as described for WT RecU (31,32). RuvB was purified from BG214 cells. Expression of RuvB was obtained by addition of 1 mM IPTG. Cells were lysed by treatment with lysozyme and sonication, and the supernatant of the lysis, which contained RuvB, was loaded onto a Ni-column. RuvB, which eluted from the Ni-column at 60 mM imidazol, was further purified by Q Sepharose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) chromatography. All proteins were purified to >98% homogeneity. The molar extinction coefficients for RecA, RecU and RuvB were calculated to be 15 200, 27 850 and 13 400 M⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm, as described (15).

The protein concentrations were determined using the above molar extinction coefficient, and RecA is expressed as moles of protein monomers, RecU and its variants as dimers and RuvB as hexamers.

Gene and protein manipulations

In vitro site-directed alanine scanning mutagenesis was performed using pCB568 DNA and the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the instructions of the supplier. The presence of the expected mutation and the absence of any other in the promoter region or in the *recU* gene were confirmed by sequencing. Protein cross-linking was used to study protein–protein interactions, as described (33). A constant amount of protein (2 μ M) was mixed in buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 50 μ g/ml BSA, 1 mM DTT, 5% glycerol] containing 1 mM MgCl₂. DSS was added to a final concentration of 50 μ M and, after incubation for 10 min at 37°C, the reactions were stopped according to the manufacturer's instructions. Rabbit polyclonal anti-RecU or anti-RecA antibodies were obtained using standard techniques. For western blotting, proteins were separated on 10% SDS-PAGE. Blots were probed with antibodies against RecU or RecA.

Transformation and survival studies

Competent *B. subtilis* cells (34), were transformed with SB19 prototrophic chromosomal DNA or pUB110 plasmid DNA. The yield of *met*⁺ (chromosomal transformation) or kanamycin-resistant (Km^R) transformants (plasmid transformation) was corrected for DNA uptake, and the values obtained were normalized relative to that of the *rec*⁺ strain, which are taken as 1 (35). Exponentially growing cells were exposed to 10 mM methylmethane sulfonate (MMS) for variable times, and serial dilutions were plated to measure survival rates, as described (35).

DNA manipulations

DNA concentrations are expressed as moles of nucleotides (nt). The binding of the HJ J3 (0.3 μ M) was assayed for 15 min at 37°C in buffer A containing 1 mM MgCl₂ by using 6% nondenaturing (nd) PAGE and autoradiography (36). Cleavage of HJ J3, labeled at one strand, was assayed for 30 min at 37°C in buffer A containing 10 mM MgCl₂ and cleavage products were analyzed by 15% denaturing (d) PAGE and autoradiography (31). The strand exchange reactions were essentially performed as described (15). Linear duplex with 3'-ssDNA termini of >150 nt (3'-tailed dsDNA) was prepared as described (37). For DNA annealing, a 420-bp DraIII-EcoRI segment derived from pGEM-3Zf(+) was gel purified and labeled at the 3'-end with [α -³²P]-dATP and Klenow enzyme. Labeled DNA (1 μ M) was heat denatured by incubation at 95°C for 10 min and immediately placed on water ice. RecU variants (200 nM) were incubated with 0.3 μ M denatured DNA (see above) in buffer A containing 1 mM MgCl₂ for 15 min at 37°C, the reaction was stopped and the deproteinized products were analyzed by 6% ndPAGE and autoradiography (31).

dATPase activity

Circular ssDNA (10 μ M) was preincubated with RecA (1.3 μ M) or RecU variants (200 nM) and 2 mM dATP ([α - 32 P]-dATP, ratio 1:100 000) for 5 min at 37°C in buffer A containing 10 mM MgOAc₂. Then the second protein was added, and incubation continued for 25 min. Aliquots were taken at time intervals and dATPase activity was determined, as described (38).

RESULTS

Isolation of *recU* mutants impaired in early stages of recombination

To test whether the putative protein–protein interaction between RecA (pI 4.9) and RecU (pI 9.5) is due to charged residues site-directed mutagenesis was used to generate *recU* mutants on highly conserved positively charged residues among Firmicutes RecU. The proficiency in chromosomal segregation and the impairment in plasmid transformation (see Introduction section) were used to search for mutants with a putative *separation-of-function* phenotype. From ~25 genuine *recU* mutants, two [*recU56* (lysine at position K56 replaced by alanine, RecUK56A) and *recU71* (R71 by alanine, RecUR71A)] were selected for further analysis.

Anucleate cells (measured as absence of DAPI-stained material) were rare in exponentially growing wild-type (WT) cells (0.05% of total cells). The frequency of anucleates (or accumulation of nonsegregated chromosomes) increased 80- and 100-fold in Δ *ruvAB* (9) and in Δ *recU* cells, respectively [(14,39), Figure 1A]. In exponentially growing Δ *recU* cells, 4.1% of total cells (719 cells analyzed) were anucleates, whereas in *recU56* or *recU71* cells the frequency of anucleates was significantly reduced (Figure 1A). Four anucleates were observed in 846 *recU56* cells analyzed and two anucleates in 738 *recU71* cells. These results suggest that unlike in Δ *ruvAB* or Δ *recU* cells, in *recU56* or *recU71* cells HJs were resolved efficiently with bias towards noncrossover products. We next measured the frequency of genetic exchange. The frequency of chromosomal transformation in Δ *recU*, *recU56* or *recU71* cells only decreased <3-fold, whereas plasmid establishment was reduced ~30-, 6- or 50-fold, respectively, relative to the *rec*⁺ values (Table 1). If during plasmid transformation RecU is only required at a late stage of HR, Δ *recU* cells should have a similar defect as Δ *ruvAB* cells. However, the frequency of plasmid transformants only decreased <3-fold in Δ *ruvAB* cells relative to *rec*⁺ values (Table 1). One hypothesis is that the presence of RecA, which is not required for plasmid transformation, might lead to the accumulation of ‘toxic intermediates’, and RecU might modulate such an accumulation during plasmid transformation (15). If this hypothesis is correct, the absence of RecA should overcome the requirement of RecU for plasmid transformation. Indeed, the absence of RecA overcame the RecU requirement during plasmid transformation (Table 1), and as expected still blocked chromosomal transformation in the *recU* context [(25,40), Table 1]. It is likely that in

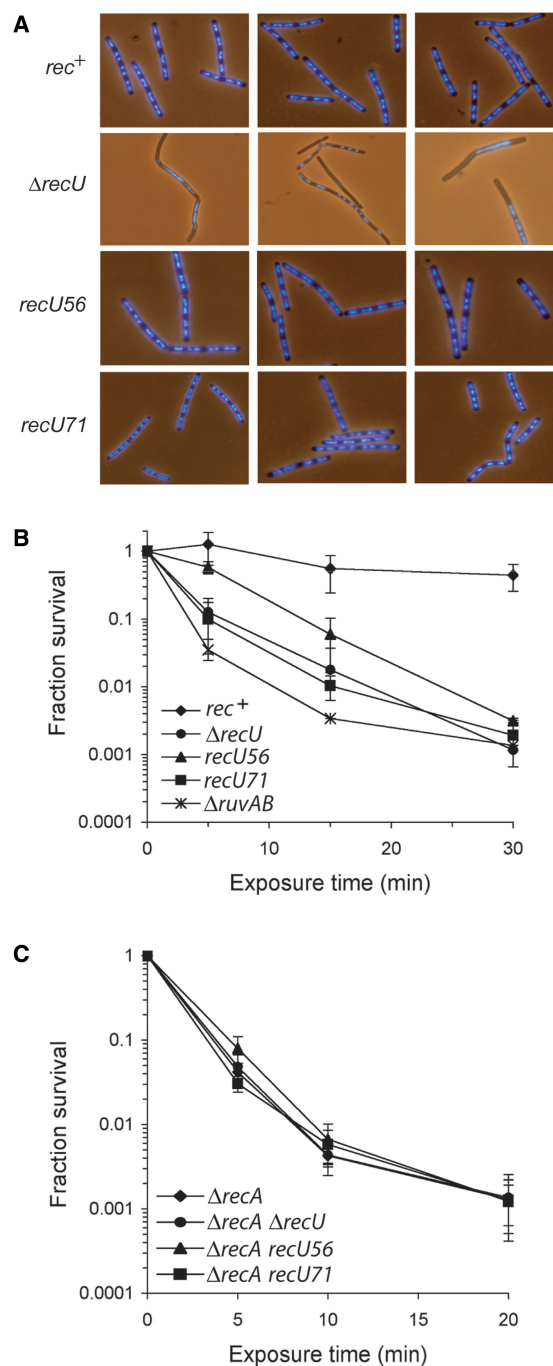


Figure 1. Segregation and DNA repair defect of Δ *recU*, *recU56* or *recU71* cells. (A) Exponentially growing WT, Δ *recU*, *recU56* or *recU71* cells in LB were fixed, stained with DAPI, and analyzed by fluorescence microscopy to visualize the nucleoid. (B and C) Survival of strains after exposure to MMS. Exponentially growing cells in LB were exposed to 10 mM MMS for a variable time, and serial dilutions were plated to measure survival rates. (B) *rec*⁺, Δ *recU*, *recU56*, *recU71* and Δ *ruvAB* cells; (C) Δ *recA*, Δ *recA* Δ *recU*, Δ *recA* *recU56* and Δ *recA* *recU71* cells.

the absence of RecU the RecA nucleoprotein filament opens an unproductive avenue that is deleterious to plasmid transformation. Alternatively, in the absence of both proteins an uncharacterized recombination pathway becomes operative (see below).

Table 1. The absence of RecA suppresses the RecU defect in plasmid transformation

Relevant genotype	Normalized plasmid transformation	Normalized chromosomal transformation
<i>rec</i> ⁺	1	1
Δ <i>recU</i> ^a	0.03	0.40
<i>recU56</i>	0.15	0.43
<i>recU71</i>	0.02	0.36
Δ <i>ruvAB</i>	0.30	0.81
Δ <i>recA</i> ^a	0.96	<0.0001
Δ <i>recA</i> Δ <i>recU</i>	0.42	<0.0001
Δ <i>recA</i> <i>recU56</i>	0.59	<0.0001
Δ <i>recA</i> <i>recU71</i>	0.40	<0.0001

The yield of *met*⁺ transformants (chromosomal transformation) and Km^R transformants (plasmid pUB110 transformation) was corrected for DNA uptake and cell viability and the values obtained normalized relative to that of the *rec*⁺ strain, taken as 1. The results are the average of at least five independent experiments and are within a 10% standard error. ^aThe transformation frequencies of Δ *recA* and Δ *recU* cells have been reported elsewhere (27,30,33) and brought here for direct comparison.

The capacity of *recU56* or *recU71* cells to catalyze recombinational repair was also analyzed. MMS is a DNA alkylating agent that causes various DNA lesions, that if unrepaired lead to a severe survival phenotype in Δ *recU* cells (29). Following acute exposure to 10mM MMS, the survival of *rec*⁺ cells was slightly affected [lethal dose to allow 10% survival (LD₁₀) of >70 min]. However, the *recU56* cells were sensitive (LD₁₀ was ~14 min) and Δ *ruvAB*, Δ *recU* or *recU71* cells were very sensitive (LD₁₀ = 4, 6 and 5 min, respectively) to 10mM MMS (Figure 1B). To address whether DNA repair was RecA-dependent in the *recU56* or *recU71* context the double mutant strains were examined. Inactivation of Δ *recA* in the *recU* context rendered cells extremely sensitive (LD₁₀ ~3 min) to 10mM MMS (Figure 1C). These results indicate that RecU action is RecA-dependent, because the double mutants were as sensitive as the Δ *recA* strain, and discard the hypothesis of opening a new recombination avenue.

RecUK56A or RecUR71A binds and cleaves HJs

RecU and variants RecUK56A and RecUR71A were over-expressed and purified towards homogeneity using a similar purification protocol. Far-ultraviolet circular dichroism spectra revealed that the proportion of α -helices and β -sheets of RecU was similar to that of the mutant proteins (data not shown). The dimeric state of the RecU (31,36) and mutant RecUK56A and RecUR71A proteins was confirmed by protein cross-linking (see below) and gel filtration chromatography (data not shown). It is likely, therefore, that the structural organization was not affected by the mutations.

RecU binds HJs with high affinity, with an apparent binding constant (K_{Dapp}) of 0.6 nM [(31), Figure 2A]. The K_{Dapp} for RecUK56A was 0.8 nM and comparable to that of the WT protein, whereas RecUR71A binds HJs with slightly higher cooperativity, albeit with a slightly lower affinity (K_{Dapp} 1.2 nM) (Figure 2A).

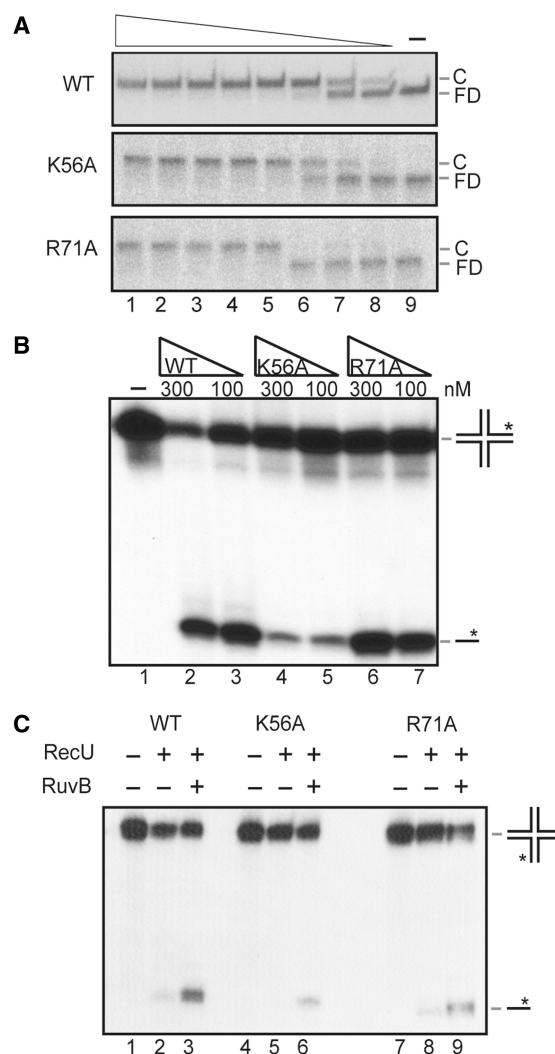


Figure 2. RecUK56A or RecUR71A binds and cleaves HJs and interacts with RuvB. (A) [γ -³²P]-HJ DNA was incubated with RecU, RecUK56A or RecUR71A (0.25–36 nM) for 15 min and the complexes were separated by ndPAGE and autoradiographed. FD: free DNA, C: protein–DNA complex. (B) [γ -³²P]-HJ was incubated with RecU variants (100 and 300 nM) for 30 min at 37°C and the cleavage products analyzed. (C) The cleavage of the HJ by RecU variants (40 nM) was analyzed with RuvB (40 nM) in the presence of 1 mM ATP γ S. In (B) and (C), the position of the asterisk indicates the strand of the HJ, which was labelled in each experiment.

The RecUK56A and RecUR71A mutants were tested for their ability to cleave HJs. Both mutants cleaved HJs and rendered products with mobility similar to the one generated by WT RecU (Figure 2B), suggesting that cleavage occurred preferentially at the consensus sequence, albeit RecUK56A was ~5-times less active. One explanation for this difference might be that the K56 residue is located in the vicinity of the catalytic centre, which is located at the dimer interface, whereas the R71 residue is far apart of it (36, see below).

Previously, it was shown that a specific interaction between *E. coli* RuvC (RuvC_{Eco}) and RuvB_{Eco} (33) stimulated RuvC_{Eco} cleavage in the presence of ATP γ S (41). RecU variants were tested for their ability to interact with RuvB by testing RuvB stimulation in a HJ cleavage

assay in the presence of ATP γ S. RuvB stimulated the resolution of HJs by RecU or its variants (Figure 2C). The stimulation of RecUK56A activity by RuvB under the conditions assayed was significant, albeit less manifest than the stimulation observed with WT or RecUR71A variant. Furthermore, the three RecU variants interacted with RuvB as detected by protein cross-linking (data not shown). These data suggest that the action of RecU variants at HJs is ~ 5 -times affected (RecUK56A) or not at all (RecUR71A), and in none of the case the coordination with the RuvB helicase is impaired. This is consistent with the observation *in vivo* that the *recU56* and *recU71* mutations did not affect the bias of HJ resolution and chromosomal segregation (Figure 1A).

RecUK56A or RecUR71A fails to inhibit the ssDNA-dependent RecA dATPase activity

Previously, it was shown that independently of the order of addition, RecU partially inhibited the hydrolysis of dATP or rATP by RecA (15). Since RecA hydrolyzes dATP in preference to rATP both in the absence or presence of SsbA (32), the ability of mutants to inhibit RecA-catalyzed ssDNA-dependent dATP hydrolysis was measured in the presence of an excess of ssDNA over proteins. Addition of RecU to the preformed ssDNA·RecA·dATP·Mg²⁺ complex partially inhibited the dATPase activity of RecA, but RecUK56A or RecUR71A failed to exert the same extent of inhibition on the RecA dATPase (Figure 3A). When RecA·dATP·Mg²⁺ was added to the preformed ssDNA·RecU complex the inhibition caused by RecU was higher, while the mutants did not affect the dATPase activity of RecA (Figure 3B). One possibility could be that RecUK56A and RecUR71A fail to inhibit the dATPase activity of RecA because they do not bind ssDNA. Previously, it was shown that RecU binds ssDNA and catalyzes renaturation of two homologous ssDNAs (31). As revealed in Supplementary Figure S1, RecUK56A or RecUR71A binds and anneals complementary ssDNAs with similar efficiency as WT RecU.

RecUK56A or RecUR71A does not inhibit dATP-dependent RecA-mediated DNA strand exchange

The effect of RecU mutant proteins in RecA-mediated dATP-dependent DNA strand exchange was then analyzed. Addition of RecU inhibited the accumulation of RecA-mediated final recombination products (nicked circular DNA, nc) between circular ssDNA and homologous linear dsDNA, but RecUK56A or RecUR71A did not inhibit RecA-mediated accumulation of nc products (Figure 4A). Similar results were observed when circular and homologous linear 3'-tailed duplex DNA were used (Figure 4B).

RecUK56A or RecUR71A fails to interact with RecA

The RecU, RecUK56A or RecUR71A proteins were tested for physical interaction with RecA in the presence of the cross-linking agent bisdisuccinimidyl suberate (DSS). RecA (38.0 kDa) ran as a homogeneous band of ~ 42 kDa (A₁), whereas RecU (23.9 kDa) ran as ~ 24 kDa (U₁) under SDS-PAGE (Figure 5).

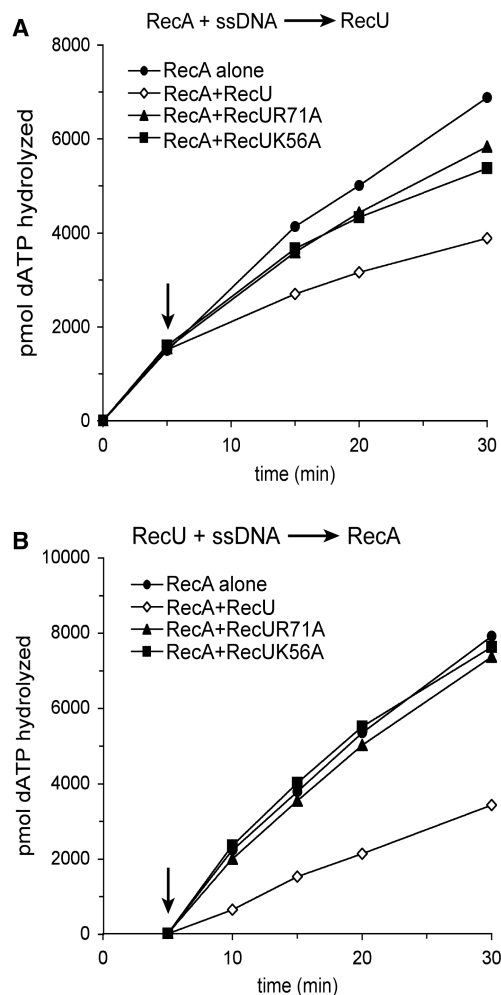


Figure 3. Effect of RecUK56A or RecUR71A on RecA catalyzed dATP hydrolysis. Circular ssDNA (10 μ M) was preincubated with RecA (1.3 μ M, in (A)) or with RecU variants (200 nM, in (B)) in buffer A containing 2 mM dATP for 5 min at 37°C. Then an RecU variant was added to RecA (A) or RecA was added to the RecU variants (B), and the reaction mixtures were incubated for further 25 min at 37°C. Aliquots were taken and the extent of RecA catalyzed hydrolysis of dATP is shown in pmols. The arrow indicates the addition of the second protein. Values are averages of four independent experiments.

In the presence of DSS, RecU bands of ~ 24 (U₁) and ~ 47 kDa (U₂) were observed. This is consistent with the observations that RecU is mainly a dimer in solution and in the crystal (36). New minor bands also appeared in RecA after DSS treatment corresponding to ~ 84 (A₂), ~ 126 (A₃) and >160 kDa (A_n), which indicated that RecA may form high order oligomers (42). When RecA was incubated with RecU and DSS, a novel band of ~ 62 kDa was observed using anti-RecA antibodies (Figure 5A, lane 5). The ~ 62 kDa protein was also observed when the membrane was revealed with anti-RecU antibodies (Figure 5B, lane 5). We have ruled out protein aggregation because 2 μ M BSA was present in all reactions, and bands corresponding to nonspecific cross-linking (e.g. RecA or RecU cross-linked with BSA) were not detected. The gel-purified 62 kDa protein was subjected to partial proteolysis followed by

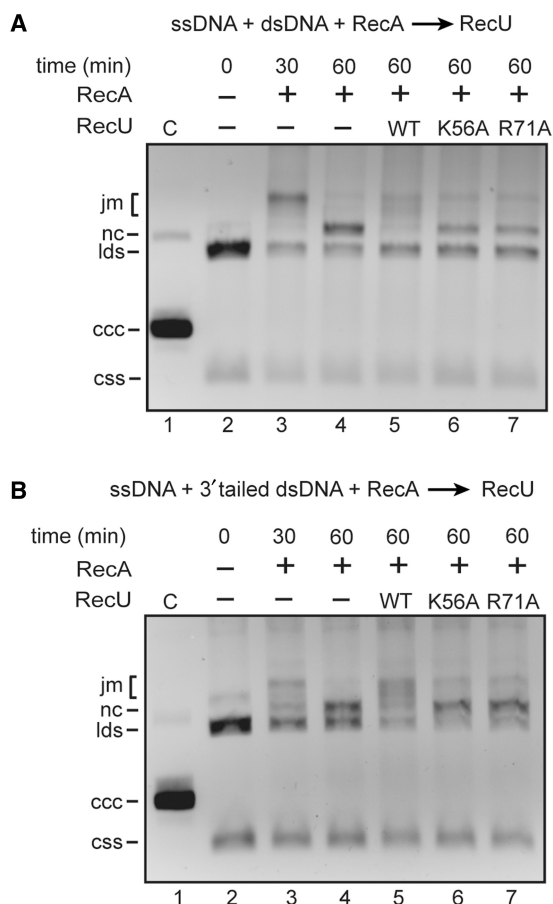


Figure 4. Effect of RecUK56A or RecUR71A on RecA-mediated DNA strand exchange. (A) Circular ssDNA (10 μ M) and homologous linear dsDNA (20 μ M) were incubated with RecA (1.3 μ M) in buffer A containing 10 mM MgOAc₂ and 2 mM dATP for 30 min at 37°C. Then a RecU variant (200 nM) was added, and the reaction mixture was incubated for further 30 min at 37°C. After deproteinization, the reaction mixtures were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. In lane 3, the reaction was stopped after the first 30 min of incubation as indicated. (B) The same experiment was performed with circular ssDNA and homologous 3'-tailed dsDNA. C, partially nicked dsDNA; ccs, circular ssDNA; lds, linear dsDNA; nc, nicked circular DNA; jm, joint molecules; ccc, covalently closed circular DNA.

MALDI-TOF analysis, and polypeptides from both proteins were present (data not shown). It is likely that this novel ~62 kDa protein might be composed of one monomer of RecU (~24 kDa) and one of RecA (~38 kDa) cross-linked, and that RecU and RecA interact even in the absence of dATP and/or ssDNA. When RecU was replaced by RecUK56A, or by RecUR71A the 62 kDa band was not detected (Figure 5, lanes 8 and 11).

DISCUSSION

In this work, we have isolated and characterized two 'separation-of-function' *recU* mutants (*recU56* and *recU71*) competent to resolve HJs with a bias towards noncrossover products (monomeric chromosomes in circular genomes), while they have lost the capacity to promote recombinational repair and plasmid transformation.

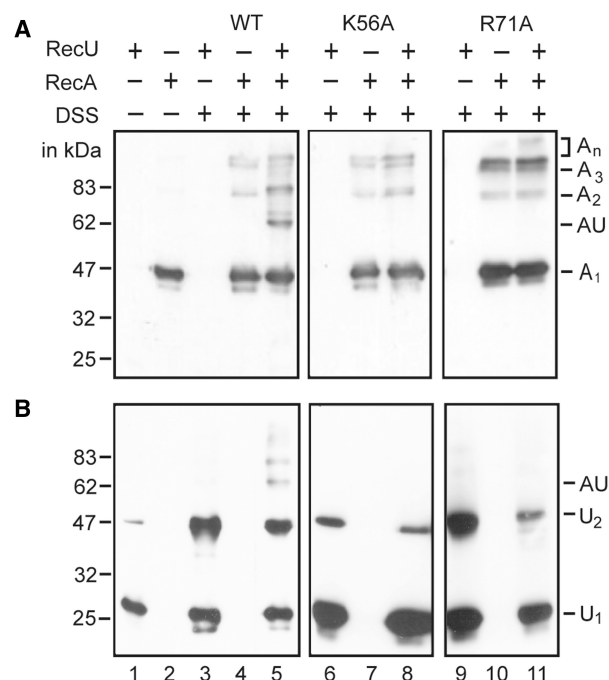


Figure 5. RecUK56A or RecUR71A does not interact with RecA. (A and B), RecUWT, RecUK56A, RecUR71A (2 μ M) or RecA (2 μ M) or combinations of them were incubated with 50 μ M DSS for 10 min. Immunoblot of cross-linked proteins using anti-RecA (A), or anti-RecU antibodies (B). The novel 62 kDa band is indicated by AU. A_n and U_n denote the predicted state of the given protein (e.g. A₁, A₂, A₃ indicates the oligomeric state of RecA). Plus and minus denote the presence and absence of the indicated protein, and/or cross-linking agent. The position of the molecular mass marker (in kDa) is shown.

Since plasmid transformation is a RuvAB-independent event, whereas it requires RecU (when RecA is present), we propose that RecU might also act outside of the resolvosome context. RecU is a RecA mediator regulating the formation of RecA presynaptic filaments, that otherwise might be deleterious during plasmid establishment in a Δ *recU* context. This is in agreement with *in vitro* data showing that (i) RecU prevents RecA nucleoprotein filament formation and RecA-mediated DNA strand exchange activities and interacts with RecA in the absence of ssDNA and/or dATP, whereas RecUK56A or RecUR71A fails to show these inhibitory activities, and (ii) RecU, RecUK56A or RecUR71A binds and cleaves HJs, and this activity is stimulated by the addition of RuvB. Altogether, these findings indicate that the mutant alleles are proficient at late stages of HR, but they are deficient at early stages because they fail to exert a negative effect on RecA activities.

The RecU homodimer contains a rigid mushroom-like cap (residues 1–55 and 90–206) and a flexible stalk region (Figure 6). The stalk contains two extended loops (residues 56–89), whose ends are disordered in the RecU structure (36), and the RecUK56A and RecUR71A mutations map in this region. RecU shows an overall 59% sequence identity with *B. stearothermophilis* RecU (RecU_{Bst}) and this identity increases to 88% within the region under analysis (Figure 6A). The full structure of the stalk region was visible in the electron density map

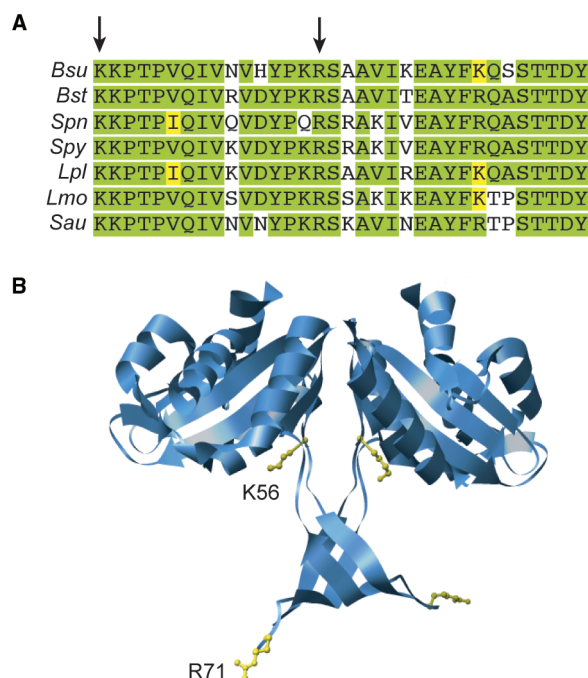


Figure 6. Conservation of mutated residues and their localization in the RecU_{Bst} X-ray structure. (A) sequence alignment of the tail region from several RecU proteins from Firmicutes. *Bsu*, *B. subtilis*; *Bst*, *B. stearothermophilus*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*; *Spy*, *S. pyogenes*; *Lpl*, *Lactobacillus plantarum*; *Lmo*, *Listeria monocitogenes*; *Sau*, *Staphylococcus aureus*. The tail region comprises residues 56–89 in RecU (PDB: 1ZP7). Arrows indicate the mutated residues. Identical residues are highlighted in green and conserved residues in yellow. (B) localization of mutated residues in the X-ray structure of RecU_{Bst} (PDB: 1Y10, Osipiuk, J., Li, H., Moy, S., Collart, F. and Joachim, A., deposited in 2004). Residues are localized in the structure of RecU_{Bst} whose tail region could be resolved, although residue numbers correspond to the RecU protein.

of RecU_{Bst} (PDB 1Y10) that crystallized in a different space group than RecU (36). Positions equivalent to RecUK56 and RecUR71 in RecU_{Bst} are clustered in the outer region of the stalk, whereas the catalytic triad (Asp88, Asp99 and Glu101) is located at the dimer interface [(36), Figure 6B].

These results and previous ones (15,31) indicate that RecU has three activities *in vitro*: (i) to mediate DNA annealing, (ii) to catalyze HJ resolution, and (iii) to modulate RecA activities. The first RecU activity, which is unlikely to be the main activity required for plasmid transformation because the absence of RecA suppresses the RecU requirement, remains elusive and will not be further discussed. Our results show that the second and third activities, which are important *in vivo*, can be genetically separated. Since the MMS sensitivity of RecUK56A or RecUR71A is similar to the one of a deletion mutant, but both mutants are able to cleave the HJ and interact with RuvB, it is likely that the third activity plays an essential role in repair-by-recombination. Is RecU action at the early stages of HR a unique event? The RuvAB_{Eco} complex, at relative high protein concentration, promotes rapid dissociation of RecA_{Eco} nucleoprotein filaments formed on supercoiled dsDNA (43–45), and removes

RecA_{Eco} from recombination intermediates *in vitro* (33), but the genetics provides only limited support for this role *in vivo*. *Pyrococcus furiosus* RadB, which regulates RadA activities, was shown to interact with RadA and the Hjc resolvase. The activity of the Hjc resolvase is modulated by RadB in an ATP-dependent manner (16). The mammalian CX3 complex (see Introduction section) is involved in the early stages of HR by binding DNA, catalyzing DNA pairing and recruiting Rad51 (19) and also plays an essential but unknown role in the resolution of recombination intermediates (19,21,23). It is tempting to speculate that a player coupling recombinase action with HJ branch migration and resolution is ubiquitous. In archaea and higher eukaryotes, this would be a Rad51 paralog, and in bacteria this might be accomplished by a direct interaction between RecA and a component of the resolvosome. How does RecU modulate RecA activities, even in the presence of an excess of free ssDNA? Previously, it was shown that: i) RecA-dATP forms filaments and the RecU protein forms blobs in ssDNA, and ii) discrete RecU blobs are embedded in the RecA nucleoprotein filaments, under a condition in which the RecA dATPase is inhibited (15). It is likely that RecU, upon interacting with RecA at the end of a filament might cap it and control RecA nucleoprotein filament dynamics. Then RuvAB would promote translocation, and RecU resolution of HJs. By this action, the early and late HR stages will be two rapid and coordinated events.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank J. Gómez-Gutiérrez for helping them with circular dichroism experiments.

FUNDING

Funding for Open Access publication charge: Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI). This work was financed by MCI grants. BFU2006-01062 to J.C.A., and BFU 2006-02907 to S.A. C.C. was a recipient of a Fellowship of the Ministerio de Ciencia e Innovación and B.C. was supported by the Juan de la Cierva program.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J. and Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, **404**, 37–41.
- Pâques, F. and Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 349–404.
- Amundsen, S.K. and Smith, G.R. (2003) Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell*, **112**, 741–744.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M.J. and Bidnenko, V. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 12783–12788.

5. Cox, M.M. (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 41–63.
6. Sanchez, H., Kidane, D., Cozar, M.C., Graumann, P.L. and Alonso, J.C. (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J. Bacteriol.*, **188**, 353–360.
7. Sanchez, H., Carrasco, B., Ayora, S. and Alonso, J.C. (2007) Dynamics of DNA double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. In Graumann, P.L. (ed.), *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, pp. 43–66.
8. McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2002) Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. *Trends Genet.*, **18**, 413–419.
9. Sanchez, H., Kidane, D., Reed, P., Curtis, F.A., Cozar, M.C., Graumann, P.L., Sharples, G.J. and Alonso, J.C. (2005) The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics*, **171**, 873–883.
10. Wen, Q., Mahdi, A.A., Briggs, G.S., Sharples, G.J. and Lloyd, R.G. (2005) Conservation of RecG activity from pathogens to hyperthermophiles. *DNA Repair*, **4**, 23–31.
11. Sanchez, H., Carrasco, B., Cozar, M.C. and Alonso, J.C. (2007) *Bacillus subtilis* RecG branch migration translocase is required for DNA repair and chromosomal segregation. *Mol. Microbiol.*, **65**, 920–935.
12. Cromie, G.A. and Leach, D.R. (2000) Control of crossing over. *Mol. Cell*, **6**, 815–826.
13. West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 435–445.
14. Carrasco, B., Cozar, M.C., Lurz, R., Alonso, J.C. and Ayora, S. (2004) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.*, **186**, 5557–5566.
15. Carrasco, B., Ayora, S., Lurz, R. and Alonso, J.C. (2005) *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3942–3952.
16. Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I.K., Mayanagi, K., Shinagawa, H. and Ishino, Y. (2000) Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33782–33790.
17. Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E. and West, S.C. (2001) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.*, **15**, 3296–3307.
18. Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Eda, K., Kagawa, W., Takata, M., Takeda, S., Yokoyama, S. and Shibata, T. (2001) Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3 Rad51C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 5538–5543.
19. Kuznetsov, S., Pellegrini, M., Shuda, K., Fernandez-Capetillo, O., Liu, Y., Martin, B.K., Burkett, S., Southon, E., Pati, D., Tessarollo, L. et al. (2007) RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J. Cell Biol.*, **176**, 581–592.
20. Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J.S. and Sung, P. (2001) Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev.*, **15**, 3308–3318.
21. Liu, Y., Masson, J.Y., Shah, R., O'Regan, P. and West, S.C. (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*, **303**, 243–246.
22. Forget, A.L., Bennett, B.T. and Knight, K.L. (2004) Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J. Cell Biochem.*, **93**, 429–436.
23. Liu, Y., Tarsounas, M., O'Regan, P. and West, S.C. (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **282**, 1973–1979.
24. Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H. and Takeda, S. (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 2858–2866.
25. Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R., Scher, B. and Cirigliano, C. (1973) Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J. Bacteriol.*, **114**, 273–286.
26. Alonso, J.C., Luder, G. and Tailor, R.H. (1991) Characterization of *Bacillus subtilis* recombinational pathways. *J. Bacteriol.*, **173**, 3977–3980.
27. Canosi, U., Morelli, G. and Trautner, T.A. (1978) The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **166**, 259–267.
28. de Vos, W.M., Venema, G., Canosi, U. and Trautner, T.A. (1981) Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 424–433.
29. Fernandez, S., Sorokin, A. and Alonso, J.C. (1998) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of *recU* and *recS* mutations on DNA repair and homologous recombination. *J. Bacteriol.*, **180**, 3405–3409.
30. Fernandez, S., Kobayashi, Y., Ogasawara, N. and Alonso, J.C. (1999) Analysis of the *Bacillus subtilis* *recO* gene: RecO forms part of the RecFLOR function. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 567–573.
31. Ayora, S., Carrasco, B., Doncel, E., Lurz, R. and Alonso, J.C. (2004) *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 452–457.
32. Carrasco, B., Manfredi, C., Ayora, S. and Alonso, J.C. (2008) *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair*, **7**, 990–996.
33. Eggleston, A.K., Mitchell, A.H. and West, S.C. (1997) *In vitro* reconstitution of the late steps of genetic recombination in *E. coli*. *Cell*, **89**, 607–617.
34. Rottlander, E. and Trautner, T.A. Genetic and transfection studies with *B. subtilis* phage SP50. (1970) I. Phage mutants with restricted growth on *B. subtilis* strain 168. *Mol. Gen. Genet.*, **108**, 47–60.
35. Alonso, J.C., Tailor, R.H. and Luder, G. (1988) Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3001–3007.
36. McGregor, N., Ayora, S., Sedelnikova, S., Carrasco, B., Alonso, J.C., Thaw, P. and Rafferty, J. (2005) The structure of *Bacillus subtilis* RecU holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure*, **13**, 1341–1351.
37. Ayora, S., Missich, R., Mesa, P., Lurz, R., Yang, S., Egelman, E.H. and Alonso, J.C. (2002) Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35969–35979.
38. Ayora, S., Weise, F., Mesa, P., Stasiak, A. and Alonso, J.C. (2002) *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 hexameric DNA helicase, G40P, interacts with forked DNA. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2280–2289.
39. Pedersen, L.B. and Setlow, P. (2000) Penicillin-binding protein-related factor A is required for proper chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **182**, 1650–1658.
40. Ceglowski, P., Luder, G. and Alonso, J.C. (1990) Genetic analysis of *recE* activities in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 441–445.
41. van Gool, A.J., Shah, R., Mezard, C. and West, S.C. (1988) Functional interactions between the Holliday junction resolvase and the branch migration motor of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **17**, 1838–1845.
42. Brenner, S.L., Zlotnick, A. and Griffith, J.D. (1988) RecA protein self-assembly. Multiple discrete aggregation states. *J. Mol. Biol.*, **204**, 959–972.
43. Iwasaki, H., Takahagi, M., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1992) *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins specifically interact with Holliday junctions and promote branch migration. *Genes Dev.*, **6**, 2214–2220.
44. Tsaneva, I.R., Muller, B. and West, S.C. (1992) ATP-dependent branch migration of Holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. *Cell*, **69**, 1171–1180.
45. Adams, D.E., Tsaneva, I.R. and West, S.C. (1994) Dissociation of RecA filaments from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 9901–9905.

Architecture of the Pontin/Reptin Complex, Essential in the Assembly of Several Macromolecular Complexes

Eva Torreira,¹ Sudhakar Jha,² José R. López-Blanco,¹ Ernesto Arias-Palomo,¹ Pablo Chacón,¹ Cristina Cañas,³ Sylvia Ayora,³ Anindya Dutta,² and Oscar Llorca^{1,*}

¹Centro de Investigaciones Biológicas/Centre for Biological Research (CIB), Spanish National Research Council (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain

²Department of Biochemistry and Molecular Genetics, 1300 Jefferson Park Avenue, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA 22908, USA

³Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

*Correspondence: olorca@cib.csic.es

DOI 10.1016/j.str.2008.08.009

SUMMARY

Pontin and reptin belong to the AAA+ family, and they are essential for the structural integrity and catalytic activity of several chromatin remodeling complexes. They are also indispensable for the assembly of several ribonucleoprotein complexes, including telomerase. Here, we propose a structural model of the yeast pontin/reptin complex based on a cryo-electron microscopy reconstruction at 13 Å. Pontin/reptin hetero-dodecamers were purified from *in vivo* assembled complexes forming a double ring. Two rings interact through flexible domains projecting from each hexamer, constituting an atypical asymmetric form of oligomerization. These flexible domains and the AAA+ cores reveal significant conformational changes when compared with the crystal structure of human pontin that generate enlarged channels. This structure of endogenously assembled pontin/reptin complexes is different than previously described structures, suggesting that pontin and reptin could acquire distinct structural states to regulate their broad functions as molecular motors and scaffolds for nucleic acids and proteins.

INTRODUCTION

Chromatin remodeling enzymes modify chromatin structure to control the access of the DNA repair and transcriptional machinery to the site where they need to operate. Several large multi-subunit ATP-dependent chromatin remodeling complexes have been discovered and among them the Ino80 complex (Ino80.com), found in yeast and humans, comprises more than 12 distinct subunits (Carrozza et al., 2003; Gallant, 2007). Ino80.com and related remodeling complexes contain two proteins of the AAA+ superfamily of ATP-binding proteins with an approximate molecular weight of 54 kDa each and named Rvb1p (or pontin) and Rvb2p (or reptin) (Gallant, 2007; Wood et al., 2000).

Rvb1p and Rvb2p are essential for the incorporation of Arp5 into and the catalytic activity of Ino80.com (Jonsson et al., 2001; Jonsson et al., 2004). Recent results link the remodeling functions of human Rvb1 with the cellular response after DNA damage (Jha et al., 2008). Pontin and reptin also participate in the maturation of small nucleolar RNAs as part of multiprotein complexes involved in small nucleolar ribonucleoprotein assembly (Boulon et al., 2008; McKeegan et al., 2007; Watkins et al., 2004; Zhao et al., 2008). Interestingly, a recent report reveals that pontin and reptin are essential for the assembly of telomerase, another ribonucleoprotein complex (Venteicher et al., 2008). Therefore, these proteins could have a general role in the assembly and regulation of several large protein complexes (Gallant, 2007; Kim et al., 2006).

Both human and yeast Rvb1/pontin and Rvb2/reptin proteins have been found to form an approximately 650-kDa complex containing equimolar amounts of Rvb1 and Rvb2 (Puri et al., 2007). An 1:6:6 stoichiometry of the Ino80 protein to Rvb1 and Rvb2 was observed in purified yeast Ino80 complexes, but it has not been defined if there is a direct interaction between Ino80 and Rvb1p or Rvb2p (Jonsson et al., 2001; Jonsson et al., 2004). Also, the two bacterially expressed human recombinant proteins can assemble into a double hexameric ring complex *in vitro* whose low resolution structure was solved using electron microscopy of negatively stained samples (Puri et al., 2007). All these results strongly indicate that the dodecamer is likely one of the possible functional forms of the proteins. Still, each protein seems to have specific roles, and some data suggest subunit specific functions performed by the individual proteins without being part of a pontin/reptin complex (Gallant, 2007). Although pontin and reptin assemble into double-ring dodecamers, it is still unknown if the rings are homo- or hetero-oligomeric. Several lines of evidence suggest that homo-oligomeric rings can exist. Recombinant pontin forms hexameric rings, indicating that at least pontin does not need reptin to oligomerize (Matias et al., 2006). Under certain conditions, human reptin can also form an approximately 400-kDa homo-oligomer (Puri et al., 2007). On the other hand, a recent study has suggested that yeast pontin and reptin exist as a hetero-oligomeric single ring (Gribun et al., 2008). Therefore, it is unclear whether

the pontin/reptin complex forms single/double rings and homo-/hetero-oligomeric rings.

The ATPase activity of both yeast pontin and reptin is required for the viability of the cell, whereas this seems dispensable for the catalytic activity of the *Ino80.com* (Jonsson et al., 2004). Actually, there are conflicting reports about the levels of ATPase activity of these proteins depending on the experimental context. Recombinant yeast pontin/reptin complex displays enhanced ATPase activity when compared with the individual proteins in some experiments (Gribun et al., 2008), whereas no detectable activity is observed by others (Jonsson et al., 2004). The recombinant human proteins purified from *Escherichia coli* can assemble a dodecamer in vitro with weak ATPase activity, which is not affected by DNA (Puri et al., 2007). On the other hand, a recombinant human pontin preparation that crystallized in its ADP-bound form showed very low activity, and it seemed that the actual conformation of the protein blocked the removal of ADP from its binding pocket (Matias et al., 2006). Thus, ATP binding and hydrolysis is indispensable for at least some of the biological roles of the Rvb proteins in vivo, but their precise contribution to their functions is unclear (Jonsson et al., 2004). A likely possibility to reconcile all these observations is that the in vivo ATPase activity of pontin and reptin could be regulated in the context of larger multiprotein complexes.

Pontin (Rvb1) and reptin (Rvb2) are homologous to the prokaryotic RuvB protein (Yamada et al., 2002), an AAA+ motor required for Holliday junction migration. Bacterial RuvB forms homo-oligomeric hexameric rings on DNA (Chen et al., 2002), and each subunit contains the characteristic Walker A and Walker B motifs that constitute the active ATP-binding site. Surprisingly, the linear structure of the eukaryotic Rvb proteins revealed that the Walker A and B motifs that form the hallmark of these ATP-binding proteins were separated by a long sequence (see Figure S1 available online). This paradox was solved recently after the resolution of the atomic structure of the human pontin (Rvb1) hexamer using X-ray crystallography (Matias et al., 2006). Each monomer comprises three well-defined domains, two of them highly reminiscent of those of the bacterial RuvB protein and containing the nucleotide binding site, whereas a third domain is inserted in the middle of the structure. This new domain (hereafter referred to as the ATPase-insert domain) is unique among AAA+ proteins, protrudes out of the hexamer, and has been shown to bind double-stranded DNA (dsDNA) and single-stranded DNA (ssDNA) (Matias et al., 2006). Interestingly, the central channel in the pontin ring has a diameter of around 18 Å, which is not wide enough to allow dsDNA to go through, but its negative electrostatic potential is similar to other helicases that bind ssDNA.

We purified yeast pontin/reptin complexes and analyzed their structure using electron microscopy under liquid nitrogen temperatures (cryo-EM) at ~13 Å resolution. The significantly improved resolution and the absence of staining agents allowed us to provide a structural model for the architecture of the pontin/reptin complex. We show that each protein forms a hexameric ring with a similar arrangement in the core domains, but each ring displays a unique conformation due to their interaction using the ATPase-insert domains. Significant changes in the conformation of the AAA+ core and the ATPase-insert domains are found compared with the crystal structure of human pontin (Matias et al.,

2006). This three-dimensional (3D) structure is different than that shown in previous studies for pontin/reptin complexes assembled in vitro from purified proteins (Gribun et al., 2008; Puri et al., 2007), suggesting that pontin and reptin could interact to form structurally distinct complexes.

RESULTS

Yeast Pontin and Reptin Purify as an Equimolar Complex that Hydrolyses ATP

Yeast pontin/reptin complex was expressed and purified using baculovirus and an N-terminal His-tagged reptin for affinity purification as described previously (Jonsson et al., 2004). Dynamic light scattering of the purified material revealed a major species of ~600 kDa (data not shown). Prior to any further structural or functional analysis, the purified protein was subjected to a gel filtration chromatography to ensure the isolation of a homogeneous assembly for electron microscopy (EM) analysis. The sample resolved in four distinct peaks, with the first three containing pontin and reptin as revealed in SDS electrophoresis of all the fractions (Figure 1A [only the fractions from the peaks are shown]). Peak 2 contained equimolar amounts of both proteins, and it was compatible with an approximately 650-kDa complex according to the calibration of the column. Although gel filtration chromatography cannot be used to estimate the exact molecular weight of the complex, the analysis of this peak via EM (see later) was only compatible with a dodecameric complex. Peak 1 corresponded to a larger aggregate or assembly, whereas peak 3 could be compatible with a predominance of monomeric forms (~50 kDa) that contained mostly reptin. Because the chromatographic column was loaded with an affinity-purified pontin/His-reptin complex, monomeric reptin could derive from a pool of free reptin protein or from the disassembly of the pontin/reptin complex. In addition, fractions from the chromatography were tested for the presence of endogenous DNA or RNA using radio-labeled [γ - 32 P]ATP, and no residual polynucleotides were detected bound to the pontin/reptin complexes after size exclusion chromatography (data not shown).

Our preparation of pontin/His-reptin was capable of hydrolyzing ATP as revealed by the ATPase activity of the purified complex at varying protein (Figure 1B) and ATP concentrations (Figure 1C). ATPase assays at an optimum ATP concentration were then also performed in the presence of several types of single- and double-stranded DNA substrates, but in none of the cases was a clear stimulation of the ATPase activity observed (data not shown). Pontin/His-reptin was also processed with the TEV protease to remove the His tag and run in a gel filtration chromatography, and the ATPase activity of each fraction was measured (Figure 1D). After removal of the His-tag, the sample behaved in the chromatography identically to the tagged protein (Figure 1D); note that this time, reptin without the His-tag ran closer to pontin in the SDS electrophoresis, but both proteins were detected via western blotting (data not shown). ATPase activity was assayed for aliquots of fractions 7 to 25, which, despite the low protein concentration of the fractions, revealed a significant although weak ATPase activity in those fractions corresponding with both the pontin/reptin complex (peak 2) and the free subunits (peak 3).

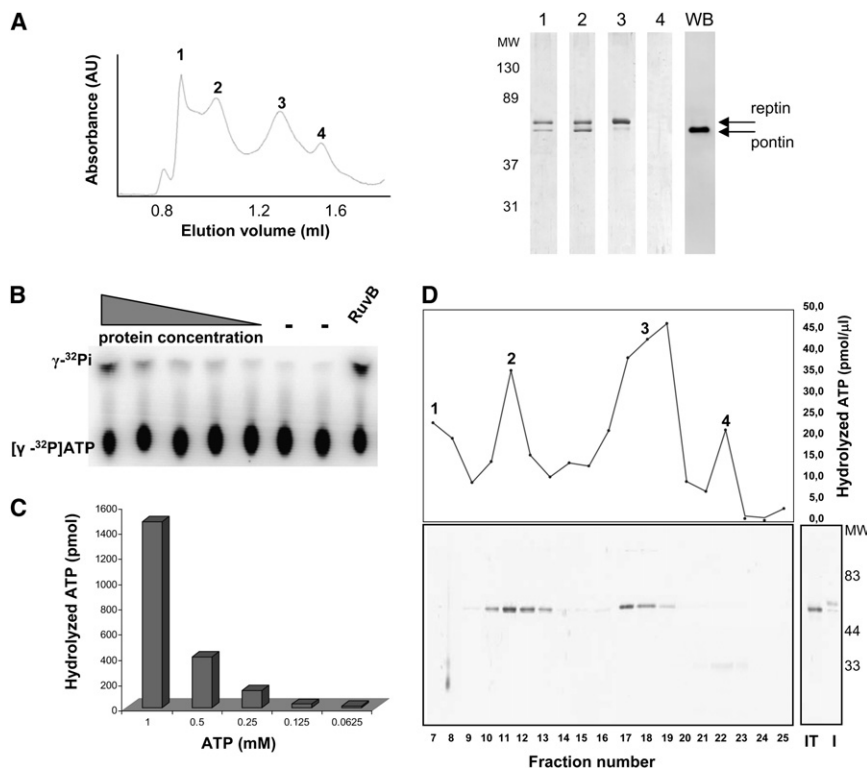


Figure 1. Purification and ATPase Activity of Pontin/Reptin

(A) Left: Elution profile of the size exclusion chromatography fractions from the purification of pontin/reptin. Right: a fraction from each of the four peaks (labeled accordingly) was analyzed via SDS-PAGE and silver staining. The lane at the far right shows the western blot of fraction 2 using polyclonal serum against pontin. MW, molecular weight standards.

(B) Effect of protein concentration on ATPase activity. ATP hydrolysis was assayed at 1 mM ATP. Protein concentrations range from 4 μ M to 4 nM monomer concentration. Control reactions were performed without protein (–) and with *Bacillus subtilis* RuvB. Free phosphate produced by ATP hydrolysis was separated from ATP by TLC.

(C) ATPase activity as a function of ATP concentration.

(D) Top: The pontin/His-reptin complex was processed with TEV protease and loaded in a gel filtration column as in (A), and the fractions were tested for ATPase activity. Bottom: SDS gel and silver staining analysis of each of the fractions tested. Note that reptin runs similar to pontin after removing the His-tag. I, input material before cleavage with TEV.

The Pontin/Reptin Complex Assembles as a Double Hexameric Ring

Freshly collected fractions from the column were directly applied to carbon-coated grids for observation in the electron microscope after negative staining. Visual inspection of the EM fields corresponding to peak 2 revealed that the majority of the views were suggestive of a four-petal flower (Figure 2A, within circles), and similar images were found regardless of the presence or absence of the His-tag (data not shown). Interestingly, this shape was very closely reminiscent of the EM images taken for double hexameric ring complexes of the related prokaryotic RuvB helicase (Chen et al., 2002), whereas they strikingly contrasted those reported for the recombinant human Rvb1/Rvb2 complex observed by EM (Puri et al., 2007). The comparison between our images and the atomic (Yamada et al., 2002) and EM structures (Chen et al., 2002) of bacterial RuvB indicated that the four petal images corresponded to side views of a double-ring pontin/reptin complex, with every two petals comprising each of the rings. This assumption was supported by the identification of hexameric circular top views under different experimental conditions (see below). The abundance of these double-layer side views confirmed that the pontin/reptin complex in peak 2 formed a double ring. Interestingly, a more careful inspection revealed two broad types of side views, one showing four petals of fairly similar size and the other with a remarkable asymmetry between the two rings (Figure 2B). In the asymmetric view, one of the rings seemed wider and rounded, whereas the other ring appeared to be narrower. This configuration contrasted with the images from the prokaryotic homo-oligomeric double ring (Chen et al., 2002) and indicated that the conformation of each ring in the pontin/reptin oligo-

mer could be different. On the other hand, the large molecular weight peak 1 (Figure 1A) was found to comprise larger aggregates of several shapes and sizes, suggesting a nonspecific aggregation of the proteins without functional significance (Figure 2C).

Several thousand images from the micrographs obtained for the double-ring oligomer after negative staining were computationally selected to analyze more systematically these views by a meticulous classification using a combination of reference-free averaging, rotational symmetry analysis, and neural network methods (Figure S2; see Experimental Procedures for details). We obtained a collection of reference-free class averages that divided the dataset into circular images and four-petal square-shaped averages (Figure 2D). Circular views showed a high component of 6-fold rotational symmetry (with low variance at this symmetry) (Figure 2E), confirming that the pontin/reptin oligomers were arranged as hexamers. Top views were nevertheless a patent minority in this dataset, which showed a marked preponderance of side views.

We studied the low-resolution 3D structure of the pontin/reptin complex using negative staining. For this purpose, the sample was extensively dialyzed against a buffer containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and then loaded in a gel filtration chromatography equilibrated with the same buffer. In another experiment, the EDTA dialyzed sample was dialyzed again in a buffer containing Mg^{2+} , incubated with ATP, and run in a size exclusion column equilibrated with ATP-Mg^{2+} . The peaks for the oligomeric fraction were observed in the microscope. Interestingly, whereas the EDTA-dialyzed sample produced images similar to the original preparation (data not shown), the ATP-incubated complexes revealed a vast increase

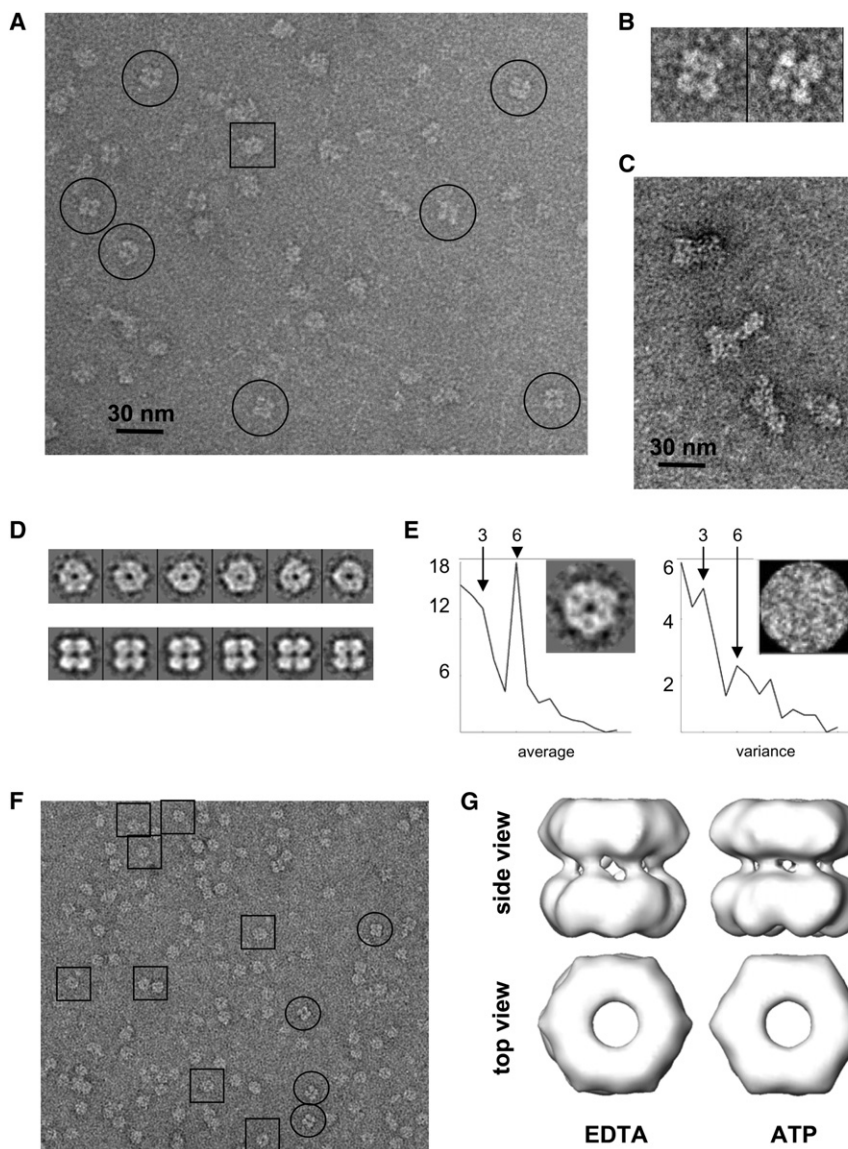


Figure 2. Negatively Stained Structure of Pontin/Reptin

(A) Electron micrograph of chromatographic peak 2 using negative staining agents. Typical side views are highlighted within circles. Scale bar = 30 nm.

(B) Two typical side views highlight the asymmetry between the two rings.

(C) Electron micrograph of chromatographic peak 1 using negative staining agents. Scale bar = 30 nm.

(D) Gallery of reference-free two-dimensional averages obtained for the images in (A) and corresponding to top (top lane) and side (bottom lane) views of the complex.

(E) Analysis of the rotational symmetry of the top particles. The left panel displays the average power spectrum and the two-dimensional average; the right panel shows the two-dimensional variance. Note that the scale of the variance is much lower.

(F) Electron micrograph of a chromatographic fraction similar to that shown in (A), but when the sample was incubated and the column was calibrated with ATP-Mg²⁺. Selected side and top views are highlighted within circles and squares, respectively.

(G) 3D structure of negatively stained pontin/reptin complexes purified via size exclusion chromatography in the presence of EDTA or ATP.

The 3D Cryo-EM Reconstruction of Pontin/Reptin Reveals an Asymmetric Double Ring Enclosing a Large Cavity

To define a higher resolution description of the pontin/reptin oligomer, fresh fractions collected from the chromatographic peak 2 when performed in the absence of any nucleotide (Figure 1A) were rapidly frozen in liquid ethane and observed at liquid nitrogen temperatures (cryo-EM) (Figure 3A). The sample revealed in cryo-EM views similar to those found using staining agents with a clear preponderance of four-petal side views

in the number of top views, being now side views a minority (Figure 2F). This is a strong indication that conformational changes have been induced upon nucleotide binding that modify the view preference during adsorption. Thousands of side view images in both experimental conditions were extracted and subjected to angular refinement, where an initial template volume was built using average top and side views and assuming a 6-fold rotational symmetry. Only the side views were used for the refinement, the standard methodology for image processing of double-ring oligomers. The refined reconstructions revealed that each ring was made of a compact density without clear separation between subunits and a flat top surface (Figure 2G), characteristics shared by the atomic structure of the human pontin hexamer (Matias et al., 2006). No significant conformational differences were found after incubation with ATP at low resolution, at least as reflected in the side views of double rings.

(Figure 3A, within circles). More than 9000 particles were selected and prepared for angular refinement methods (following the scheme summarized in Figure S3). Initially, the 6-fold rotational symmetry (c6) found in top views and in the previously resolved EM and X-ray structures was assumed during image processing to build an initial template volume, which was the input for further refinement. Unexpectedly, the resulting reconstruction revealed a double-ring protein in which each ring displayed a significant dissimilar degree of resolution and each ring behaved differently in response to changing the threshold for rendering. We suspected this could be a reflection of heterogeneity in our data set, either from genuine structural conformational variability or data quality, leading us to explore the source of this heterogeneity. First, we extensively evaluated the possibility of other symmetries in the complex as the roots of such heterogeneity, such as d6 (the two rings showing identical structure), c3, and c2, or even no symmetry at all. Also, we tested whether each

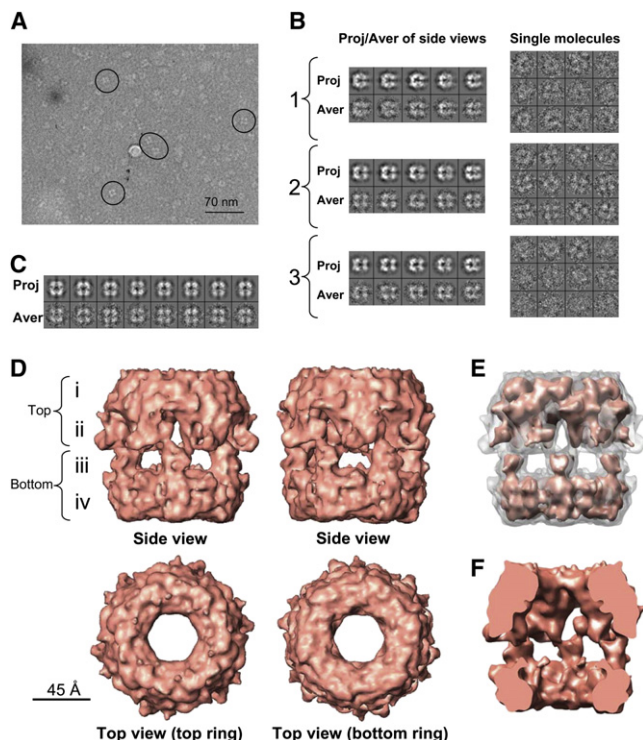


Figure 3. Cryo-EM Structure of Pontin/Reptin

(A) Cryo-electron micrograph with typical side views within circles.
 (B) Typical projections and two-dimensional averages obtained after refinement of each of the three subsets obtained after splitting the total data set (see text). A gallery of selected particles corresponding to the class averages displayed for each subgroup is shown at the right panels.
 (C) Gallery of projections and two-dimensional averages obtained after the independent refinement of the data from the selected subgroup (number 2).
 (D) Two side views of the cryo-EM structure of pontin/reptin rotated around their longitudinal axis (top row) and top views of the reconstruction (bottom row). The reconstruction has been rendered to a threshold representing roughly 75% of its total mass in order to highlight the structural features. Scale bar = 4.5 nm.
 (E) Volume rendered at the threshold used in (D) as a white transparency but containing the same volume rendered at a higher threshold representing around 25% of the protein mass.
 (F) Cross-sectional images of the side view displayed above.

ring could display a different rotational symmetry by performing several supervised classifications (results not shown). After all these analyses, we found that only 6-fold rotational symmetry (c6) was compatible with the data set, prompting us to look for other possible causes of heterogeneity. To this end, the whole data set was processed, allowing the sorting of the images of the particles into three possible output reconstructions. Once the mutireference refinement converged, particles associated with each model were split and processed independently from scratch. This procedure resulted in the sorting of particles into three classes containing 33.5%, 34.5%, and 32% of the total images. Class 1 mainly comprised particles corresponding with unconventional views in between a “typical” top and a “typical” side view (Figure 3B). Class 3 included particles with a very low signal-to-noise ratio. Classes 1 and 3 seemed to correspond with images with a high possibility of being incorrectly classified

and aligned, because they gave rise to different solutions depending on the bias introduced by the initial references (results not shown). Hence, these particles seemed responsible for the defects in the initial reconstruction performed with the whole data set. Conversely, class 2 was enriched in the well characterized four-petal views corresponding to rotations along the longitudinal axis of the complex. These particles were then separated from the rest of the data and processed completely independently from scratch (Figure 3C) to derive a 3D reconstruction that did not show any of the defects previously observed. Therefore, this classification procedure allowed us to isolate a self-consistent subset of the data by removing either noisy images or those of molecules with conformations different to the major species (further controls detailed in [Experimental Procedures](#)).

The 3D reconstruction of the pontin/reptin complex at ~ 13 Å resolution (Figure S4) revealed a dodecamer containing two rings, each showing a distinct conformation, the top ring being slightly wider than the bottom ring (Figure 3D). The complex showed a height of ~ 130 Å and a diameter ranging from ~ 90 Å at the narrower end and ~ 135 Å at the widest region. Any rendering threshold maintaining the contact between the protein densities produced a volume compatible with a ~ 650 kDa complex, assuming an average density for proteins of 1.35 g/ml. Both rings defined a large internal closed cavity (Figure 3F) communicating with the outside by central holes in each ring and by lateral entrances distributed around the equator of the double-ring. When this reconstruction was inspected from its side, the double hexamer revealed four differentiated layers of density (i-iv) (Figure 3D). The outer top and bottom layers (i and iv) each consisted of a compact ring likely comprising the core domains of two Rvb hexamers, whereas the center of the oligomer resolved in two distinct regions (ii and iii). Layer iii was mainly made of lateral holes separated by six thin protein densities projecting toward the top while layer ii contained six large masses separated by small holes. Therefore, the two Rvb rings were interacting back to back in an apparent asymmetric fashion. This asymmetry and the distinct morphology of each ring was genuine, because it appeared during the first steps of refinement even if complete symmetry between the two rings was used as bias in the initial template reference (d6 symmetry). Rotations along the longitudinal axis of the double ring would be responsible for the asymmetric and symmetric side views detected on negative staining (compare the two side views in Figure 3D).

Pontin and Reptin Can Form Homo-oligomers

The homo- or hetero-oligomeric nature of the pontin/reptin rings remains a major unsolved issue. While performing gel filtration analysis of a pontin/His-reptin preparation kept for long time on storage, we observed that the chromatographic peak corresponding to assembled oligomers was enriched in pontin (Figure 4A). Importantly, gel filtration could discriminate between assembled oligomers and free subunits and the oligomers appeared in the microscope as typical “four-petal” side views and also top views (Figure 4B). Because only the His-tag in reptin was used for purification, pontin and reptin were initially equimolar in the preparation (Figure 1A, peak 2). Therefore, the most likely explanation for the preponderance of pontin in the

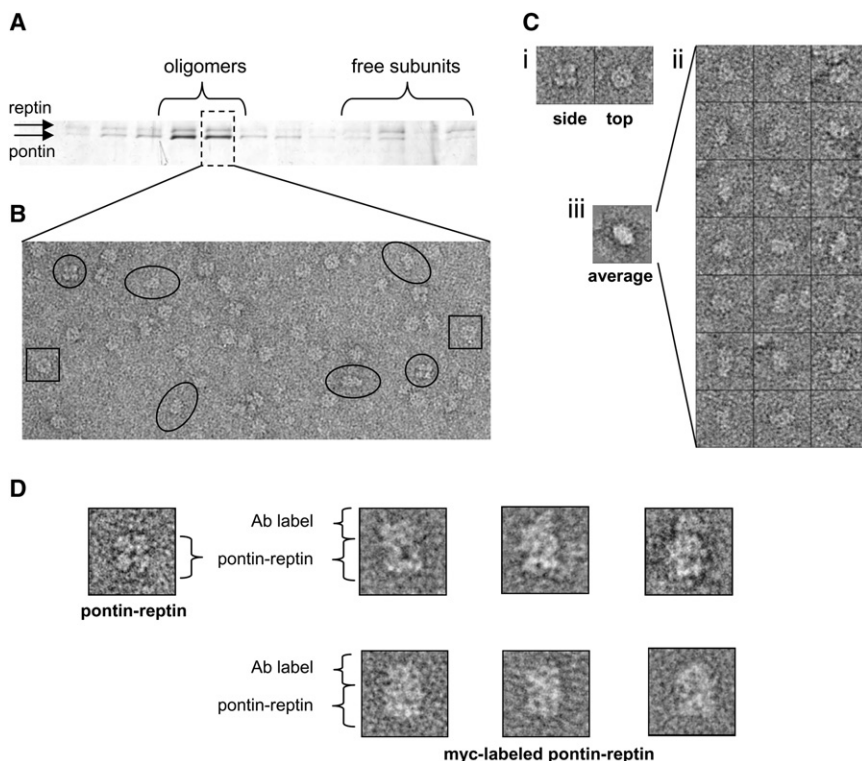


Figure 4. Pontin and Reptin Can Form Homo-oligomers

(A) Elution profile of the size exclusion chromatography of a pontin/reptin preparation after long-term storage. Similar results were found for columns calibrated with EDTA (not shown) and ATP (shown).

(B) EM field of a selected fraction of the chromatography. The sample incubated with ATP produced a better distribution of distinct views in the microscope, where “four-petal” side views (circles), top views (squares), and putative side views of single rings (ellipsoids) were detected.

(C) Analysis of the views present in a fraction of the chromatography corresponding to oligomers revealed both top and side views (i), for which a reference-free two-dimensional average was obtained (iii).

(D) Selected particles of pontin/reptin-myc complexes labeled with an anti-myc antibody.

oligomeric fraction is the disassembling of some double rings into single rings and free subunits. The gel filtration column did not have sufficient resolving power to discriminate double and single rings as perfectly separated peaks, but double rings could be unambiguously defined by the aspect of their “four-petal” side view in the microscope (Figure 4B, circles). On the other hand, top views could belong to either double- or single-ring oligomers (Figure 4B, squares). Furthermore, views were found in the micrographs with dimensions compatible with a putative side view of a single-ring oligomer (Figures 4B and 4C). The greatest abundance of pontin in the oligomeric fraction could only be consistent with the existence of homo-oligomers. Hetero-oligomeric rings containing equimolar pontin and reptin would always produce equimolar bands in the SDS gel of size-exclusion purified oligomers, regardless of being single or double rings. On the other hand, homo-oligomeric rings can produce a nonequimolar fraction after the disruption of the initial double-ring complex if some protein stays as free subunits, as we observed (Figure 4A).

To further investigate this issue, we performed a labeling experiment to locate reptin in either one or the two rings of the double-ring complex, to indicate the presence of homo- or hetero-oligomeric rings, respectively. The N-terminal His-tag was not adequate for such an approach, because it locates at the center of the complex according to our model (see below), not allowing a discrimination of the label between the two rings. We therefore purified a pontin/reptin complex containing a C-terminal myc-tag in reptin which, according to the model proposed below, should be pointing outward. We incubated these complexes with saturating amounts of purified anti-myc antibody, and the immune complexes were repurified

and observed in the microscope. Whereas only a few characteristic undistorted double rings images were observed, these were always decorated with putative antibody density in just one end of the double-ring side view,

suggesting that all reptin monomers locate at the same ring (Figure 4D).

The Core Domains of Pontin/Reptin Show Conformational Differences with the Atomic Structure of Human Pontin

Due to the high homology between the human and yeast proteins (Figure S1), we selected the atomic structure of human pontin (Figures 5A and 5B) (Matias et al., 2006) to fit into the 3D reconstruction. The “tips” of the ATPase-insert domains (residues 123–237) (Figure 5B) were removed from the analysis due to its expected flexibility. Initially we performed a rigid-body fit using the hexameric atomic structure of pontin for an exhaustive 6-dimensional search to explore all its possible orientations within the whole EM map (Garzon et al., 2007). The best solutions were then further refined allowing the monomers to rotate and translate inside the EM density but maintaining the 6-fold symmetry (see Experimental Procedures). These experiments unambiguously located the core domains of the Rvb proteins within the ends of the molecule (cross-correlation coefficients 0.86 and 0.79 for each ring) (Figure 5C [only two monomers per ring shown for clarity]). The complete human pontin structure could not fit the EM density, because the conformation of the ATPase-insert domains in the crystal structure did not match that of the pontin/reptin complex. The comparison between the EM density and the fitted atomic structure did not permit the definition of the absolute handedness of the map based on differences in correlation coefficients, and one of the hands was selected for representation (similar results were obtained with the other hand [Figure S5]).

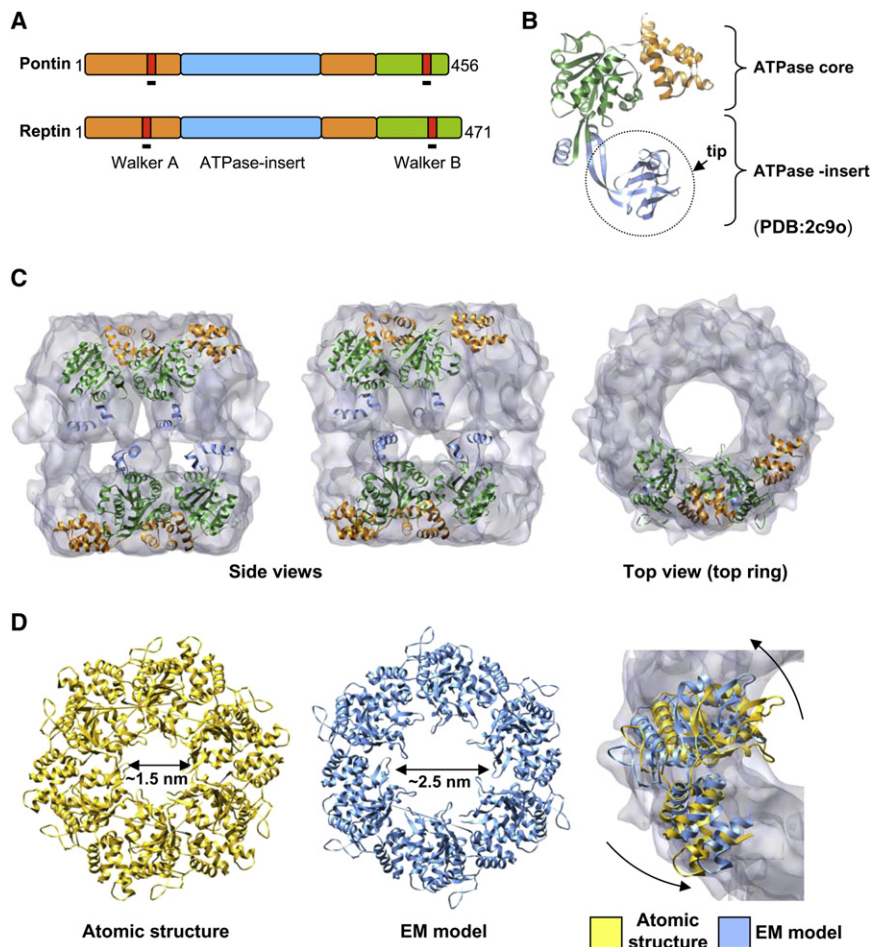


Figure 5. Location and Conformational Changes in the Core Domains of Pontin/Reptin

(A) Primary structure and domains present in pontin and reptin. Color codes for domains are maintained throughout the figure.

(B) Atomic structure of human pontin (PDB file 2c9o) (Matias et al., 2006). Color codes as in (A).

(C) Fitting of the core domains of the atomic structure of Rvb1p into the EM density. For clarity, only two consecutive monomers are shown.

(D) Conformational differences between the atomic structure of human pontin (yellow color) and the atomic model after fitting into the EM density (blue color). At the right, the two structures are represented superimposed on to the EM density of one of the rings.

(Figure 6B). Relatively simple motions of the ATPase-insert domains would be sufficient to account for this rearrangement (Figure 6C).

DISCUSSION

We now propose a high-resolution structural model of the pontin/reptin complex and its implications in the functional properties of this chromatin remodeling factor. The complex is formed by the back-to-back interaction between two hexameric rings. The core domains of each ring are facing outward and they probably have a very similar structure in

These fitting experiments revealed that the monomers of each ring had significantly rotated outward and counter-clockwise around the longitudinal axis by ~5 to ~10 degrees compared with the crystal structure (Figure 5D). Such movements were found to impact the shape and dimensions of the internal cavity, but more importantly, the central openings of the top and bottom rings were now slightly larger in the EM structure (>2.5 nm in diameter) than in the crystal structure (~1.5 nm in diameter) (Matias et al., 2006).

Pontin/Reptin Double Ring Is Maintained by Interactions Between the ATPase-Insert Domains of Opposite Rings

To identify a more precise location of the ATPase-insert domains, the density of the fitted atomic core domains (Figure 5) was subtracted from the experimental EM map after adequate normalization and scaling. The difference map obtained mostly represented those densities of the whole pontin/reptin complex not accounted for by the core domains of both rings (Figure 6A and Figure S5, green color). The differences present at the ends of the rings were minor, and their location suggested that they corresponded with areas of the protein not solved in the atomic structure of pontin. Importantly, the bulk of the differences were located in the equatorial regions of the top ring, and these densities could easily accommodate the ends of ATPase-insert domains from both rings by manual fitting

both rings. The integrity of the complex is maintained through interactions between the ATPase-insert domains of each ring. The monomers have rotated outward compared with the crystal structure of human pontin (Matias et al., 2006), leaving a larger central hole which could now be sufficient to accommodate both ssDNA or dsDNA. These conformational changes could be caused by the structural strain introduced as a result of the close interaction between the two rings mediated by the ATPase-insert domains (Figure 6C).

The cryoEM structure of the pontin/reptin complex reveals that each ring displays a distinct conformation. Importantly, this asymmetry between rings is not caused by large differences in the conformation of the core domains, but it is mostly due to the way the two rings interact. The tips of the ATPase-insert domains of both rings appear in contact in the proximity of one of the rings that consequently adopts an apparently wider profile (layer ii), whereas the proximity of the other ring (layer iii) contains six lateral holes. Relatively minor torsions of the ATPase-insert domains around a flexible beta strand pair functioning as a hinge would certainly be plausible, because these domains seem inherently flexible (Matias et al., 2006). Interestingly, the ATPase-insert domain of eukaryotic pontin/reptin was proposed to act as a novel DNA binding module based on its close resemblance with replication protein A, an ssDNA-binding protein, and it was shown to bind both ssDNA and dsDNA in electrophoretic

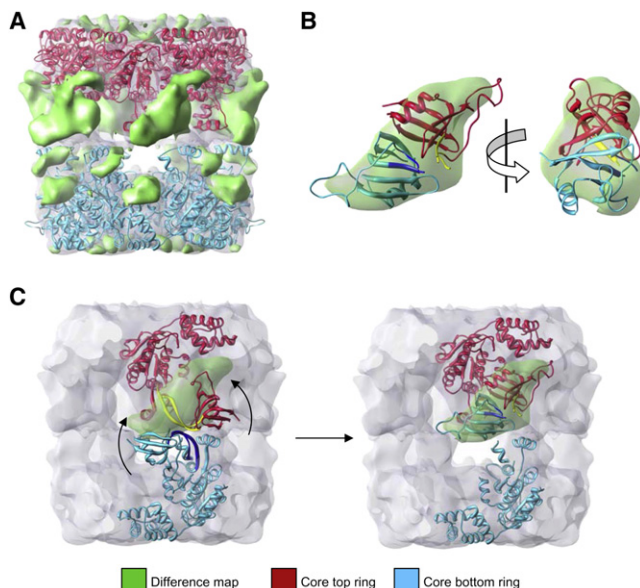


Figure 6. Location of the ATPase-Insert Domains in the Pontin/Reptin Double Ring

(A) Difference map between the EM reconstruction and the core domains of the atomic structure of pontin after fitting within the EM structure, shown as a green solid density over the EM reconstruction in transparency. The fitting results of the atomic model for the core domains are also displayed.

(B) Two orthogonal views of the difference map density of one pair of top and bottom subunits where the tips of the ATPase-insert domains from both rings have been fitted.

(C) Modeling of the speculative conformational changes required to adapt the conformation of the tips of the ATPase-insert domains as observed in the crystal structure (Matias et al., 2006) to the experimental EM density. The proposed region acting as hinge is colored in dark blue and yellow.

mobility shift assays (Matias et al., 2006). The configuration we find in the pontin/reptin complex implies that some regulation of DNA binding could be potentially bound to the formation of the double-ring. Nevertheless, it will not be surprising if the DNA binding activity of pontin/reptin is also regulated by the oligomerization state of these proteins in the context of the complete remodeling complex.

Many AAA+ proteins are typically organized in the form of double rings containing the AAA+ rings facing outward to provide a mechanical motor, whereas functional domains face inward (Yamada et al., 2002). The structural model we propose for the pontin/reptin complex agrees with this general structural framework. Still, there is not a clear function for these ATPase hexameric rings within their remodeling complexes. Mounting evidence is accumulating to suggest that maybe a major role of pontin/reptin could be the function as a platform for several protein-protein and nucleic acid-protein interactions (Jonsson et al., 2004; McKeegan et al., 2007; Watkins et al., 2004). Rvb1p has been shown to recruit Arp5 to yeast Ino80.com (Jonsson et al., 2004), and recent reports have added further evidence revealing a role of these proteins in the assembly of small nucleolar RNAs (Boulon et al., 2008; McKeegan et al., 2007; Zhao et al., 2008), in the recruitment of Tip49 to complexes with histone acetylase transferase activity (Jha et al., 2008), and in the assembly of the telomerase holoenzyme (Venteicher et al., 2008).

The double-ring pontin/reptin complex contains equimolar amounts of each of the two proteins, and the possibility that each protein forms an independent hexamer or that each ring of the complex contains three monomers of each protein should be considered. The high homology between pontin and reptin implies that they cannot be distinguished at the resolution of these EM studies. Homo-oligomeric hexamers of human pontin have been assembled in vitro and their structure solved at atomic resolution, proving that this protein can by itself form a hexameric oligomer (Matias et al., 2006). Several of the experiments we have performed here suggest that each ring is composed of just one of the proteins forming homo-oligomeric hexamers, although a fully definitive and conclusive proof is still lacking. A recent report has proposed that recombinant yeast pontin and reptin assemble into a hetero-oligomeric single-ring (Gribun et al., 2008). If analyzed carefully, the original experiments by these authors described that only single rings were assembled in vitro when incubating both proteins together, but a formal proof of the hetero-oligomeric nature of such rings was missing. Given the close sequence similarity between pontin and reptin, these proteins could potentially interact into homo- or hetero-oligomeric single or double rings, depending on the actual experimental conditions. Such behaviors have been described for the thermosome, a chaperon built by two highly related subunits (α , β) (Nitsch et al., 1997). Nevertheless, it is possible that the double and single hexameric rings, and even homo- and hetero-oligomers, could represent different functional states of these proteins (see below).

A low-resolution structure of the human pontin/reptin complex derived from negatively stained images has been reported recently (accession code EMD-1317 at <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/emsearch/form>) (Matias et al., 2006), which is strikingly distinct to our reconstruction. The four-petal EM images of the yeast pontin/reptin complex seen in this study are reminiscent of the images from bacterial RuvB (Chen et al., 2002), though they differ greatly from the EM images of the published human double-ring complex (Puri et al., 2007). The atomic structure of human pontin reveals a continuous ring with tightly packed monomers and whose top surface is remarkably flat (Matias et al., 2006). These features are shared by both rings of the yeast pontin/reptin we have solved here (Figure 3D), whereas they are incompatible with the published human pontin/reptin complex, and such difference between both structures cannot be only explained by the disparity in resolution.

A possible way of reconciling all the different structures published could be the existence of several conformations of the pontin/reptin complexes where double and single rings and homo- and hetero-oligomers can form. Several functions have been ascribed by several authors to free subunits, single and double-rings of the Rvb proteins. Given the complex set of events that are controlled by pontin and reptin, it is likely these proteins transit through several functional states comprising either different conformations of the proteins or different forms of oligomerization. The different 3D structures solved for the pontin/reptin complex, including ours, could represent distinct structural transitions helping these proteins integrate the functions of the AAA+ motor domains, nucleic acid binding activities and a surface for protein-protein interactions into one complex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Purification of the Pontin/Reptin Complex

Yeast pontin/His-reptin complexes were cloned and expressed using recombinant baculovirus and a His-tag at the N-terminus of reptin (Jonsson et al., 2004). Size exclusion chromatography was performed using a Superdex 200 PC 3.2/30 column equilibrated with 25 mM Tris HCl (pH 8.0), 125 mM NaCl. All purification steps were performed in the absence of nucleotides or magnesium. In a different set of experiments, the pontin/His-reptin complex was dialyzed against a buffer containing 2 mM EDTA and loaded in the same gel filtration column. In addition, the EDTA dialyzed sample was again dialyzed against a buffer containing magnesium, incubated with ATP, and purified in a size exclusion column equilibrated with 15 mM MgCl₂ and 1 mM ATP.

ATPase Activity of Pontin/Reptin

ATPase assays with the purified sample contained variable amounts of protein (from 4 μ M to 4 nM monomer concentration) and were performed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM NaCl, 10 mM Mg(AcOH)₂, 0.05 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 1 mM ATP and 100 nM [γ -³²P]ATP (specific activity 3000 Ci/mmol), for 1 hr at 25°C. Reactions were stopped by adding 2 μ l of 0.5 M EDTA (pH 8.0). ATP hydrolysis was determined by thin-layered chromatography (TLC). Aliquots (1 μ l) from each reaction were spotted onto PEI cellulose TLC plates, and the substrate ([γ -³²P]ATP) was separated from the product (γ -³²Pi) with ATPase running buffer (200 mM potassium-phosphate buffer [pH 7.5]). Plates were dried and quantified on a Phosphorimager. In a separate experiment, pontin/reptin complexes were processed with TEV protease to remove the His tag and were separated via gel filtration. The ATPase activity of aliquots of the fractions (4 μ l of 50 μ l of total volume) was assayed similarly, but reactions were performed in a 10- μ l volume for 16 hr at 25°C.

Electron Microscopy and 3D Reconstruction of Negatively Stained Pontin/Reptin

Fractions corresponding with oligomers were applied to carbon-coated grids after glow discharge and were negatively stained with 2% uranyl acetate or 1% uranyl formate. Observations were performed with a JEOL 1230 electron microscope operating at 100 kV, and micrographs were recorded under low-dose conditions at a nominal magnification of 50,000. Micrographs were digitized using a Minolta Dimage Scan Multi Pro scanner at 2400 dpi and averaged to 4.2 Å/pixel. The contrast transfer function of the microscope for each micrograph was estimated using CTFFIND3 (Mindell and Grigorieff, 2003) and corrected. Several thousands of individual particles for each experiment were extracted using the “boxer” program implemented in EMAN (Ludtke et al., 1999). The raw data were analyzed using reference-free alignment and classification methods implemented in EMAN (Ludtke et al., 1999) and maximum likelihood (Scheres et al., 2005). Neuronal network classification and analysis of the rotational symmetry in the data set were performed using procedures in XMIPP (Sorzano et al., 2004). An initial 3D template for refinement was built using an average of the top and side views of the complex and the 6-fold symmetry of the molecule.

Cryo-electron Microscopy and 3D Reconstruction of Pontin/Reptin

A few microliters of the chromatographic peak 2 (in the absence of nucleotides) freshly after collecting the fractions were applied to Quantifoil R 2/2 holey grids that had been coated with a thin layer of carbon. The sample was then vitrified and observed in a FEI Tecnai G² operated at 200 kV and equipped with a Gatan liquid nitrogen specimen holder. Images were recorded at a nominal magnification of 50,000 and digitized to a final 2.12 Å/pixel. Then, 9316 particles were extracted and the contrast transfer function of the microscope corrected by flipping phases. Particles were then subjected to 3D refinement using EMAN (Ludtke et al., 1999). The starting 3D reference was built using “startcsym” command and 6-fold rotational symmetry. The two rings of the initial reference were then symmetrized to avoid a bias toward an asymmetric structure. This refined reconstruction revealed significantly different levels of resolution in each ring. We suspected that the source of this difference could be particles in the data set in either a different conformation or with a low signal-to-noise ratio. We split the data set in three subgroups using the multi-refine command in EMAN. The final reconstruction was performed using one homogeneous

class of particles, 6-fold symmetry and using only side views. We validated the classification performed by refining the class 2 sub-data set using as initial 3D template the reconstruction of the other subgroups that provided a strong initial bias toward the incorrect conformation. In all cases, the final model matched the data set and not the reference volume used, supporting the classification. The resolution of the 3D map was estimated via Fourier Shell Correlation to be 13.6 Å, 11.10 Å, and 9.8 Å according to a correlation coefficient of 0.5, 0.33, and 0.145, respectively. The high-frequency components of the final reconstruction above 13.6 Å resolution were eliminated by low-pass filtering.

The absolute handedness of the reconstruction could not be defined at the resolution of the map, because the cross-correlation values for the fitting of atomic structure of the human pontin into the EM map were similar at both hands (correlation differences obtained for opposite hands <0.05). The application of the methodology proposed by Rosenthal and Henderson (Rosenthal and Henderson, 2003) was evaluated and found not possible because similar cross-correlation values were obtained when comparing projections of the 3D reconstruction (filtered at the resolution of a negative stain experiment) at both possible hands.

Fitting of the Atomic Structure into the EM Map

We performed a rigid-body fit of the human pontin hexameric ring (PDB file 2c9o) in each ring of the EM reconstruction using ADP_EM (Garzon et al., 2007). To avoid interferences of flexible segments of the molecule, we removed the “tips” of the ATPase-insert domains (residues 123–237) and the terminal C-terminal helix (438–449). From the best scores found, we performed an additional refinement step by freely moving a single monomer using a multidimensional Powell optimization routine. Subsequently, 6-fold rotational symmetry was applied to the refined monomer to complete a hexameric ring, discarding those solutions producing steric clashes with contiguous monomers. This procedure allowed the monomers to rotate and translate inside the density improving the scores from 0.72 to 0.79 and from 0.77 to 0.86 for top and bottom rings, respectively.

The discrepancy between the best fitting model and the EM map were computed using standard procedures after filtering and scaling the atomic model according to the experimental map. Six densities were localized that could be attributed to the flexible tips removed for the rigid body fitting. To substantiate this hypothesis, we found that the ends of the ATPase-insert domains from both rings could be manually fitted into this difference map.

Labeling of Myc-Tagged Reptin

A monoclonal anti-myc antibody (Sigma) was repurified via size exclusion chromatography to eliminate aggregates. The peak of the purified antibody was analyzed under the microscope, revealing a clean preparation of antibodies showing no aggregation. Freshly purified antibody was then immediately incubated with a pontin/reptin complex containing an myc tag at the C terminus of reptin (Jonsson et al., 2004) under saturating amounts of antibody for 30 min at 4°C. The incubation was then loaded via size exclusion chromatography, and the fraction corresponding to the immunocomplex was observed under the microscope.

ACCESSION NUMBERS

The cryo-EM map of yeast pontin/reptin complex has been deposited in the 3D EM database (<http://www.ebi.ac.uk/msd/>) under accession code EMD-2865.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include five figures and can be found with this article online at <http://www.structure.org/cgi/content/full/16/10/1511/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects SAF2005-00775 and SAF2008-00451 (O.L.), BFU2006-02907 (S.A.), and BFU2007-65977/BMC (P.C.) from the Spanish Ministry of Science, CAM S-BIO-0214-2006 (O.L. and P.C.) from the Autonomous Region of Madrid and CA89406 from the National Institutes of Health (A.D.). Llorca's group was additionally supported by project

RD06/0020/1001 of the Red Temática Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) and the Human Frontiers Science Program Organization (RGP39/2008). E.A.P. was supported by a contract from the Autonomous Region of Madrid. We are very thankful for help provided by Jaime Martín-Benito, Gabriel Piedrafita, Javier Varela, Emilia Aporta, and Dolores Alonso. We are also grateful for the support of the computing resources from the Galicia Supercomputer Centre (CESGA) and the Barcelona Supercomputing Centre, Spain.

Received: April 25, 2008

Revised: July 23, 2008

Accepted: August 9, 2008

Published: October 7, 2008

REFERENCES

- Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jady, B.E., Rothe, B., Pescia, C., Robert, M.C., Kiss, T., et al. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* 180, 579–595.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19, 321–329.
- Chen, Y.J., Yu, X., and Egelman, E.H. (2002). The hexameric ring structure of the *Escherichia coli* RuvB branch migration protein. *J. Mol. Biol.* 319, 587–591.
- Gallant, P. (2007). Control of transcription by pontin and reptin. *Trends Cell Biol.* 17, 187–192.
- Garzon, J.I., Kovacs, J., Abagyan, R., and Chacon, P. (2007). ADP_EM: fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. *Bioinformatics* 23, 427–433.
- Gribun, A., Cheung, K.L., Huen, J., Ortega, J., and Houry, W.A. (2008). Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol.* 376, 1320–1333.
- Jha, S., Shibata, E., and Dutta, A. (2008). Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 28, 2690–2700.
- Jonsson, Z.O., Dhar, S.K., Narlikar, G.J., Auty, R., Wagle, N., Pellman, D., Pratt, R.E., Kingston, R., and Dutta, A. (2001). Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J. Biol. Chem.* 276, 16279–16288.
- Jonsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A., and Dutta, A. (2004). Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell* 16, 465–477.
- Kim, J.H., Choi, H.J., Kim, B., Kim, M.H., Lee, J.M., Kim, I.S., Lee, M.H., Choi, S.J., Kim, K.I., Kim, S.I., et al. (2006). Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 631–639.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., and Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* 128, 82–97.
- Matias, P.M., Gorynia, S., Donner, P., and Carrondo, M.A. (2006). Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* 281, 38918–38929.
- McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Boulon, S., Bertrand, E., and Watkins, N.J. (2007). A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol. Cell Biol.* 27, 6782–6793.
- Mindell, J.A., and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 142, 334–347.
- Nitsch, M., Klumpp, M., Lupas, A., and Baumeister, W. (1997). The thermosome: alternating alpha and beta-subunits within the chaperonin of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *J. Mol. Biol.* 267, 142–149.
- Puri, T., Wendler, P., Sigala, B., Saibil, H., and Tsaneva, I.R. (2007). Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J. Mol. Biol.* 366, 179–192.
- Rosenthal, P.B., and Henderson, R. (2003). Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 333, 721–745.
- Scheres, S.H., Valle, M., and Carazo, J.M. (2005). Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics* 21 (Suppl 2), ii243–ii244.
- Sorzano, C.O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2004). XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 148, 194–204.
- Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., and Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132, 945–957.
- Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2004). Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol. Cell* 16, 789–798.
- Wood, M.A., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2000). An ATPase/Helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell* 5, 321–330.
- Yamada, K., Miyata, T., Tsuchiya, D., Oyama, T., Fujiwara, Y., Ohnishi, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., Ariyoshi, M., Mayanagi, K., and Morikawa, K. (2002). Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol. Cell* 10, 671–681.
- Zhao, R., Kakiyama, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., et al. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.* 180, 563–578.



COMMUNICATION

The N-Terminal Region of the RecU Holliday Junction Resolvase Is Essential for Homologous Recombination

Begoña Carrasco^{1†}, Cristina Cañas^{1†}, Gary J. Sharples²,
Juan C. Alonso^{1*} and Silvia Ayora¹

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, C/Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

²Centre for Bioactive Chemistry, University of Durham, Department of Chemistry, University Science Laboratories, South Road, Durham DH1 3LE, UK

Received 16 March 2009;
received in revised form
23 April 2009;
accepted 27 April 2009
Available online
5 May 2009

Edited by J. Karn

The RecU Holliday junction (HJ)-resolving enzyme is highly conserved in the *Firmicutes* phylum of bacteria. In *Bacillus subtilis*, the *recU* gene has two putative initiation codons, at positions 1 and 33. In *rec*⁺ cells, only the full-length RecU polypeptide (206 residues, 23.9 kDa) was detected even after different stress treatments. To address the relevance of the flexible N-terminus, we constructed mutant variants. Experiments *in vivo* revealed that *recU*Δ1–32 (which initiates at Met33 and encodes RecUΔ1–32) and *recU*31 (the conserved Arg31 residue was substituted with alanine to give RecUR31A) are genuine RecU mutants, rendering cells impaired in DNA repair and chromosomal segregation. RecU has three activities: It (i) cleaves HJs, (ii) anneals complementary strands and (iii) modulates RecA activities. RecUR31A binds and cleaves HJ DNA *in vitro* as efficiently as wild-type RecU, but RuvB·ATP·γS·Mg²⁺ fails to stimulate the RecUR31A cleavage reaction. In contrast, RecUΔ1–32 forms unstable complexes with DNA and fails to cleave HJs. RecU and its variants are capable of promoting DNA strand annealing and exert a negative effect on deoxy-ATP-dependent RecA-mediated DNA strand exchange. This study shows that the flexible N-terminus of RecU is essential for protein activity.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Hjc; PrfA; recombination protein U; RecA; vancomycin

Homologous recombination (HR) supplies one of the main avenues for repair of DNA damage and the major cellular pathway to restart arrested replication forks. Repair of DNA double-strand breaks involves the establishment of a four-way DNA crossover from the pairing of strands from homologous duplexes, known as the Holliday junction (HJ). *In vivo*, the junction can then migrate through

the action of a translocase, which in the case of bacteria is either RecG or RuvAB.^{1,2} Branch migration by the RuvAB complex is necessary to locate an appropriate consensus sequence at the junction crossover for recognition by a structure- and sequence-specific HJ endonuclease (e.g., RuvC or RecU). HJ-resolving activities have been found in all three biological kingdoms.³ Bacterial HJ resolvases can be divided into two classes—those similar to *Escherichia coli* RuvC, which belongs to the RNase H/integrase superfamily, and those similar to *Bacillus subtilis* RecU, which belongs to the nuclease superfamily.³ In both cases, RuvB stimulates the HJ resolution reaction.^{4,5} If cleavage is biased toward non-crossover, the separation of the paired duplexes on a circular chromosome renders two monomers at cell division.

RecU has two putative start sites

The RecU enzyme, which shares structural similarity with the archaeal HJ resolvase Hjc and bacterial

*Corresponding author. E-mail address: jcalonso@cnb.csic.es.

† B.C. and C.C. contributed equally to this work.

Present address: B. Carrasco, Area de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Spain.

Abbreviations used: dsDNA, double-stranded DNA; HJ, Holliday junction; HR, homologous recombination; jm, joint molecule; K_{d,app}, apparent binding constant; MMC, mitomycin C; MMS, methyl methane sulfonate; nPAGE, native PAGE; Rif, rifampicin; RPU, recombination protein U; ssDNA, single-stranded DNA; Vc, vancomycin; WT, wild type; YJ, three-stranded dsDNA.

EcoRV/PvuII restriction enzymes, cleaves HJs in a sequence-specific manner.^{3,6–8} Previously, it was shown that *B. subtilis* RecU (a 206-residue polypeptide with a predicted molecular mass of 23.9 kDa) purified with an *E. coli* overexpression system has HJ-resolving activity.⁶ It has also been suggested that recombination protein U (RPU) (an N-terminally truncated version of RecU consisting of 174 residues with a predicted molecular mass of 20.3 kDa) is also a genuine HJ resolvase. Many of the *recU* genes have two potential initiation codons that could encode two co-linear polypeptides [RecU (P39792) and/or RPU (A3F2U7); Fig. 1a]. RecU orthologs are highly conserved among *Firmicutes* and constitute a single Pfam protein family (PF03838) with 157 representatives. Members of this family can be divided into three groups: group 1 is composed by *Bacillus*-like RecU proteins with 195 to 213 residues and in possession of a long, flexible N-terminal region (Fig. 1c); group 2 includes *Clostridia*- and *Mollicutes*-like RecU proteins of 166 to 177 residues and that harbors a shorter N-terminus (Fig. 1b); and group 3 comprises the RPU-like protein that lacks the flexible N-terminus and the NRGM tetrad (Fig. 1a; A3F2U7). It is possible that

recU encodes two co-linear polypeptides, with the longer form yielding RecU and the shorter form starting from an internal in-frame codon and yielding RPU (see Fig. 1a). The initiation codon of the *bona fide* HJ resolvase is unknown. Note that in the remainder of this article, unless stated otherwise, the indicated genes and products are of *B. subtilis* origin.

In the X-ray structures of *B. subtilis* and *Bacillus stearothermophilus* RecU, deposited in the Protein Data Bank, the first 33 residues could not be resolved. Secondary structure predictions from the poorly conserved N-terminal region do not suggest the presence of any α -helical or β -strand element. Except for an extended stalk region, the structure of RecU superposes well with all known crystal structures of archaeal HJ resolvases, which are only around 123 residues long.

B. subtilis RecU is closely related to other putative RecU proteins within the *Firmicutes* phylum (varying from 90% identity with *Bacillus amyloliquefaciens* RecU to 36% with its counterpart from *Clostridium* sp. L2-50). The level of homology is increased if RPU is employed for the analysis. Indeed, a comparison of the N-terminal region of RecU from ~95 species

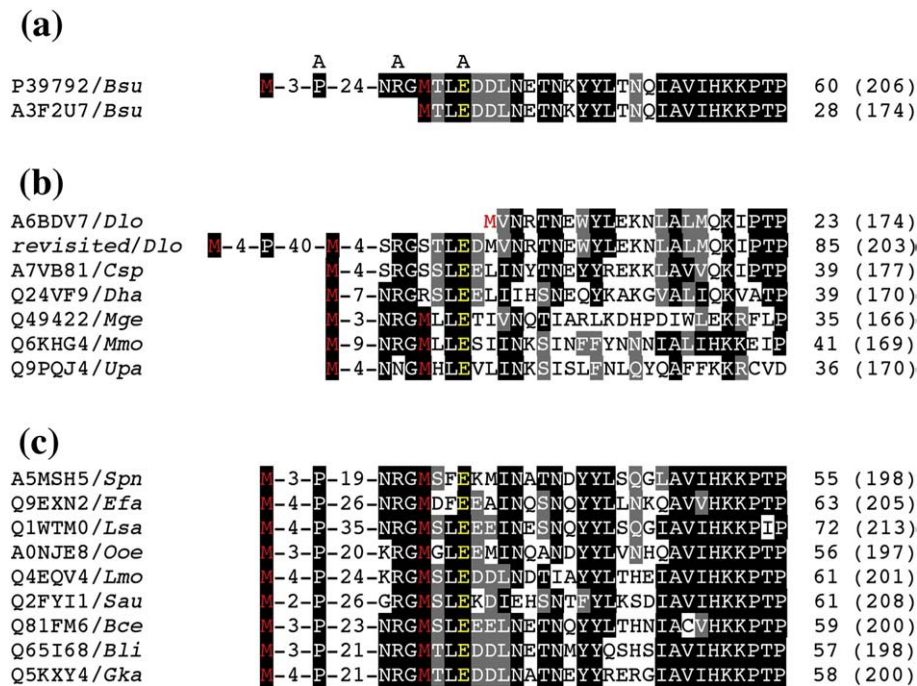


Fig. 1. Sequence alignment of the N-termini of representatives of the *Firmicutes* RecU family. (a) The two annotated *B. subtilis* RecU variants [RecU (P39792) and RPU (A3F2U7)] are shown. Conserved Met residues are highlighted in red, and their distance from the conserved Pro or Asn–Arg–Gly (NRG) triad is indicated. The catalytic Glu (E36) residue is shown in yellow. Mutated residues Pro to Ala (P5A), Arg to Ala (R31A) and Glu to Ala (E36A) are indicated above the sequence alignment. (b) RecU orthologs of approximately 170 amino acids (with the single exception of *D. longicatena*). The *D. longicatena* entry is presented twice, with the proposed correct version of *D. longicatena* RecU (revisited) deduced from the original DNA sequence entry. (c) RecU orthologs of approximately 200 amino acids. The UniProt accession numbers are given, followed by the abbreviations for each microorganism: *Bsu*, *B. subtilis*; *Dlo*, *D. longicatena*; *Csp*, *Clostridium* sp. L2-50; *Dha*, *Desulfitobacterium hafniense*; *Mge*, *M. genitalium*; *Mmo*, *Mycoplasma mobile*; *Upa*, *Ureaplasma parvum*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*; *Efa*, *Enterococcus faecalis*; *Lsa*, *L. salivarius*; *Ooe*, *Oenococcus oeni*; *Lmo*, *Listeria monocytogenes*; *Sau*, *Staphylococcus aureus*; *Bce*, *Bacillus cereus*; *Bli*, *Bacillus licheniformis*; *Gka*, *Geobacillus kaustophilus*. Identical residues are shadowed in black, and conserved residues are shadowed in gray. The number of the last amino acid shown in the alignment is indicated for each protein, and the overall protein length is given in parentheses.

derived from the three classes within the *Firmicutes* phylum reveals poor conservation and a degree of uncertainty concerning the correct assignment of the initiation codon (see Fig. 1). In addition, the length of the flexible and poorly conserved N-termini is variable (see Fig. 1b and c). A direct correlation between the length of the N-terminal region and overall protein length, which stretches from 166 (*Mycoplasma genitalium*) to 213 (*Lactobacillus salivarius*) residues, is also not apparent.

The conserved Glu residue, E36 in *B. subtilis* RecU, known to be involved in catalysis⁸ seems to be absent in the deposited sequence of *Dorea longicatena* RecU protein. However, analysis of the nucleotide sequence of the *recU* region from *D. longicatena* reveals the presence of an extended 5' region. Translation of this region reveals the presence of a longer N-terminal end and highlights conserved

Arg-Gly and Glu residues (equivalent to R31-G32 and E36 of *B. subtilis* RecU, respectively) (Fig. 1b, revisited/*Dlo*). With the correction of the N-terminal sequence, the first amino acids of *D. longicatena* and *Clostridium* sp. L2-50 are now conserved. If a non-canonical ribosomal binding site is considered, even a conserved Pro residue at position 6 is apparent (Fig. 1b, revisited/*D. longicatena*). It is therefore likely that the conserved residues equivalent to R31-G32 and E36 of *B. subtilis* occur in all RecU proteins.

In certain representatives of the *Clostridia* class, the internal ATG start codon is missing. Taken together, these data suggest that the flexible N-terminal region of RecU, including a conserved Arg residue located one amino acid before the possible second initiation codon, could be necessary for RecU function in HR.

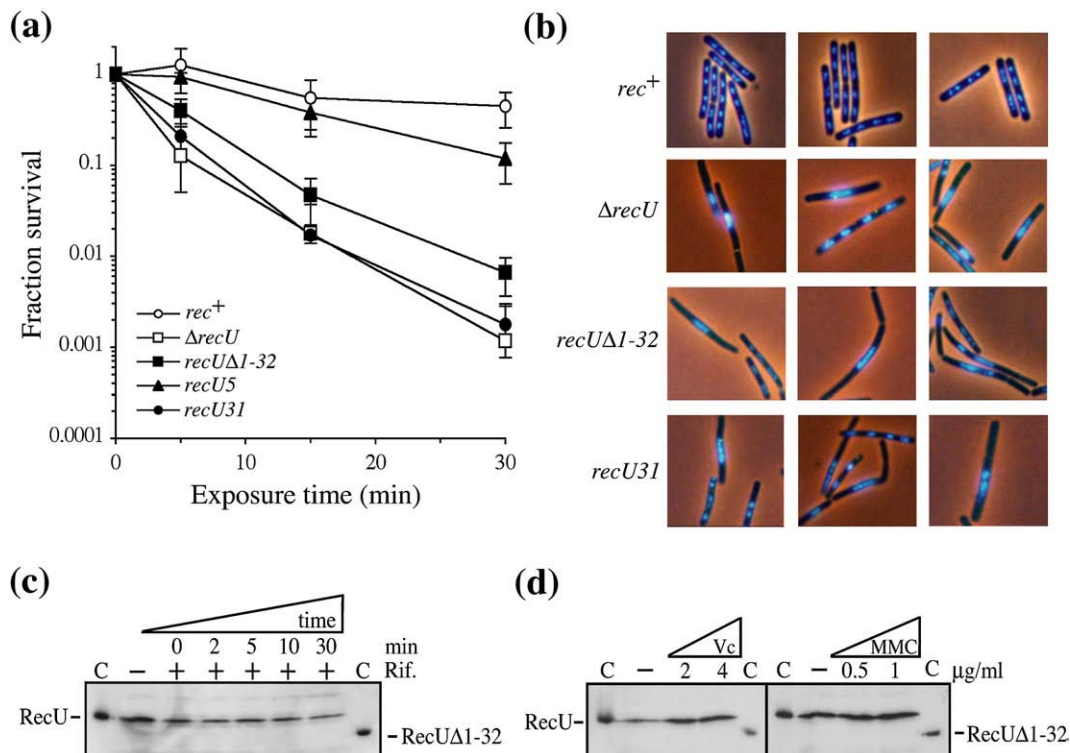


Fig. 2. Analysis of *B. subtilis* *recU5*, *recU31* and *recUΔ1-32* mutant strains. The WT sequences of codon 5 and codon 31 were changed from Pro to Ala (CCT to GCT) to give *recU5* (RecUP5A) and from Arg to Ala (CGC to GCC) to yield *recU31* (RecUR31A), respectively, by *in vitro* site-directed alanine mutagenesis using pCB568 DNA (Table S1) and a QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). PCR amplification of pCB568 DNA was used to delete the first 32 codons ($\Delta 1-32$) of RecU; a ribosomal binding site was placed at an appropriate position upstream of the ATG codon (M33). The presence of only the expected alteration was confirmed by nucleotide sequencing. Mutations were subcloned into pHP14 plasmids and transformed into BG855 ($\Delta recU$) cells. (a) Survival of mutant strains following exposure to MMS. Exponentially growing BG214 cells (OD_{560} of ~ 0.4) or BG855 cells bearing the relevant plasmid were exposed to 10 mM MMS at different time intervals, and serial dilutions were plated to measure survival rates, as described previously.¹⁰ (b) Nucleoid segregation of $\Delta recU$, *recUΔ1-32* and *recU31* cells. Exponentially growing cells (OD_{560} of ~ 0.4) were fixed, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and analyzed by fluorescence microscopy to visualize the nucleoid. (c and d) Stability and induction of the RecU protein. (c) BG214 cells were grown exponentially in LB medium to an OD_{560} of ~ 0.4 , Rif (200 μ g/ml) was added and the culture was incubated for various times at 37 °C. Cell growth was halted by addition of NaN_3 , cells were harvested and equal protein amounts were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting as described previously.⁵ (d) BG214 cells were grown exponentially in LB medium to an OD_{560} of ~ 0.4 , the culture was split and induced by addition of 2 or 4 μ g/ml Vc or 0.5 or 1 μ g/ml MMC (final concentration) and incubated for a further 30 min at 37 °C. Cell growth was halted by addition of NaN_3 , cells were harvested and equal protein amounts were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting. The purified RecU and RecU $\Delta 1-32$ proteins were used as mobility standards.

Table 1. Effect of plasmids carrying *B. subtilis* RecU mutations on the survival of UV-irradiated *ruvEco* mutants

Mutant plasmid	Fraction surviving (30 J/m ²) ^a		
	WT _{Eco} (<i>ruv</i> ⁺) strain	<i>ruvAB</i> _{Eco} strain	<i>ruvC</i> _{Eco} strain
pRecU ⁺	0.18	0.0064	0.40
pHP14 (vector)	0.40	0.0037	0.0021
pRecUP5A	0.38	0.010	0.37
pRecUR31A	0.16	0.0039	0.0018
pRecUE36A	0.60	0.0026	0.0019

^a *E. coli* AB1157 [wt_{Eco} (*ruv*⁺)], N2057 (*ruvAB*_{Eco}) and GS1481 (*ruvC*_{Eco}) cells were grown to an OD₆₅₀ of 0.4, serially diluted and spotted onto agar plates. Plates were exposed to UV light at a dose rate of 1 J/m² per second. Survival was estimated by comparison with an unirradiated control.

RecU variants with mutations in the N-terminal region are genuine recombination mutants

To establish whether the N-terminus plays any role in RecU activity, we removed the first 32 codons of the 206-codon *recU* gene ($\Delta 1-32$) to generate a 174-codon-long *rpu* gene, termed *recU* $\Delta 1-32$ (Fig. 1a, A3F2U7 RPU protein) here. Although there is no strict conservation of sequence in the N-terminal region, there is a predominance of positively charged side chains and five conserved residues [a Pro (P) at position 5 and the conserved NRGGM tetrad] at residues 30–33 (Fig. 1a). Two substitution mutants [P5A (*recU5*, RecUP5A) and R31A (*recU31*, RecUR31A)] were therefore constructed to probe the importance of these amino acids for RecU function. As a control, the conserved E36 residue, involved in catalysis,⁸ was substituted by alanine (*recU36*) (Fig. 1a).

The capacity of *recU* $\Delta 1-32$, *recU5* and *recU31* cells to catalyze HR was investigated. Cells bearing a null *recU* mutation ($\Delta recU$) are extremely sensitive to the DNA damage caused by the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS).⁹ Survival of wild-type (WT or *rec*⁺) and *recU5* cells was only slightly affected by acute exposure to 10 mM MMS [lethal dose to allow 10% survival (LD₁₀) of >50 min]. In contrast, the $\Delta recU$, *recU31* and *recU* $\Delta 1-32$ cells were significantly more sensitive to this dose of MMS (LD₁₀=4, 5 and 8 min, respectively) (Fig. 2a).

In $\Delta recU$ cells, accumulation of anucleate cells increases by ~80-fold as compared with the WT strain.¹¹ As a measurement of proper HJ resolution, we also analyzed chromosomal segregation of *recU5*, *recU31* and *recU* $\Delta 1-32$ cells. The absence of 4',6-diamidino-2-phenylindole-stained material was rare in WT cells (~0.05% of the cells lack a nucleoid) (Fig. 2b). The *recU31* and *recU* $\Delta 1-32$ strains presented a segregation defect similar to $\Delta recU$ cells, with ~4% of anucleate cells (Fig. 2b), whereas in *recU5* cells, the amount of anucleates (~1% of total cells) was intermediate (data not shown). Since the DNA repair and chromosomal segregation defects of *recU* $\Delta 1-32$ and *recU31* cells were comparable with those of cells deficient in the RecU protein, it was concluded that *recU* $\Delta 1-32$ and *recU31* are genuine mutants and that the integrity of the N-terminus is necessary for RecU activity.

To confirm the results, we examined plasmids carrying the *recU5*, *recU31* and *recU36* (as a control)

alleles for their ability to restore the UV resistance of *ruvAB* and *ruvC* mutants of *E. coli*. Previous results demonstrated that constructs carrying RecU are capable of complementing the *ruvC*_{Eco} mutant repair defect and that the RecU activity depends on the presence of RuvAB_{Eco}.¹² Plasmids expressing RecUP5A restored UV resistance of an *ruvC*_{Eco} mutant to a similar level as the WT construct, confirming that this mutation does not significantly impair RecU activity (Table 1). As with WT RecU, the RecUP5A was unable to fully restore UV resistance in cells deficient in RuvA_{Eco} and RuvB_{Eco}. The RecUR31A and RecUE36A constructs were however unable to complement the *ruvC*_{Eco} mutant and showed UV sensitivity comparable with the plasmid vector alone (Table 1). Plasmids carrying *recU31* were also unable to significantly improve the extreme UV sensitivity of an *ruvC*_{Eco} *recG*_{Eco} strain (data not shown). The results with *E. coli* *ruv* mutants verify the importance of R31 for RecU resolution activity *in vivo*, whereas P5 is dispensable. Since RecU function is apparently unaffected by the P5A mutation and the purified RecUP5A protein was indistinguishable from WT RecU *in vitro* (data not shown), this mutation is not considered further here.

Our results show that the flexible N-terminus (residues 1–32) of RecU and a conserved Arg residue (R31) residing within the conserved 30–NRGM–33 tetrad fulfill an essential function in *B. subtilis* HR *in vivo*.

Synthesis of RPU is not detectable *in vivo*

RecU is a protein with multiple roles and activities, such as single-stranded DNA (ssDNA) annealing, HJ cleavage, interaction with RuvB and modulation of RecA.^{5–7} It is possible that the 20.3-kDa RPU only performs some of the activities associated with RecU and that hence the experiments described in Fig. 2a and b are not sufficiently sensitive to detect any partial functionality. To address whether RPU (equivalent to RecU $\Delta 1-32$) is expressed in WT cells, we investigated its presence under a variety of conditions. An exponentially growing culture of the WT strain was treated with rifampicin (Rif) (to block *de novo* transcription), cells were lysed and proteins were separated on SDS-PAGE. Blotted proteins were probed with polyclonal antibodies raised against the RecU protein. Only a single protein that co-migrated with full-length RecU (23.9 kDa) was observed (Fig.

2c). The failure to detect the putative RPU cannot be attributed to a detection defect because the polyclonal anti-RecU antibodies recognized purified RecU Δ 1–32 with similar efficiency as the WT RecU (Fig. 2c).

The basal level of RecU in exponentially growing WT cells was $\sim 3500 \pm 240$ molecules per cell ($\sim 4.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$). Upon addition of Rif, the amount of RecU was only slightly reduced during the first 30 min, suggesting that the half-life of RecU is relatively long *in vivo* given the 30 ± 2 -min cell doubling time in the absence of Rif (Fig. 2c and Fig. S1).

The *recU* (also termed *prfA*) *ponA* operon is subject to regulation by RNA polymerase containing an alternative sigma factor, σ^M , and utilization of this promoter is increased 2.8-fold upon vancomycin (Vc)

addition or by acid, heat, ethanol and superoxide stresses.¹³ Exposure of exponentially growing WT cells to Vc induced the synthesis of RecU by 2- to 3-fold (Fig. 2d). The accumulation of RPU was not observed after a cell envelope stress condition elicited by Vc addition. Alternatively, it is possible that we failed to detect RPU expression because it is a short-lived protein. To address this question, we also examined expression of RecU Δ 1–32 from exponentially growing cells. The basal level of RPU (RecU Δ 1–32) was not detected. However, when the *recU* Δ 1–32 gene was expressed from an external promoter (the strong promoter of the *cat* gene), reduced levels (by more than 10-fold) as compared with those for RecU were observed (data not shown). It is therefore likely

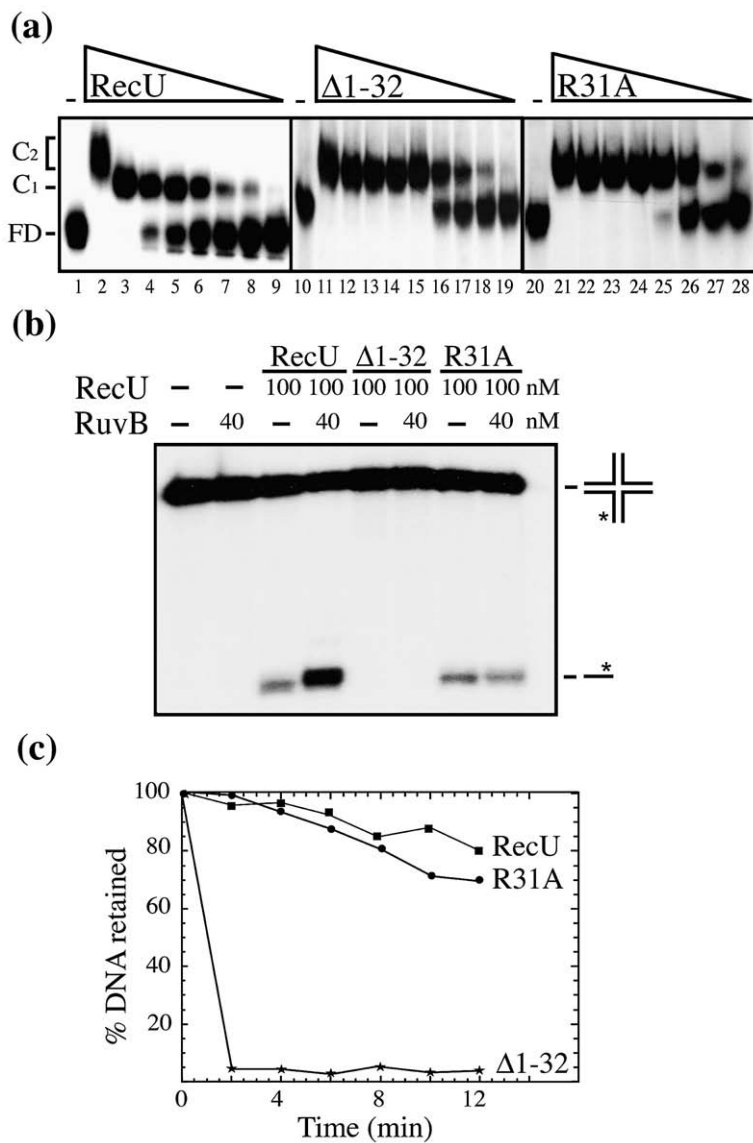


Fig. 3. RuvB-ATP γ S-Mg²⁺ fails to stimulate RecUR31A·HJ cleavage, and RecU Δ 1–32 is incapable of HJ cleavage. RecU, RecUR31A, RecU Δ 1–32 and RuvB proteins were purified to greater than 98% homogeneity. The molar extinction coefficients for RecUR31A, RecU Δ 1–32 and RuvB were calculated to be 27,850, 24,870 and 13,400 M⁻¹ cm⁻¹, respectively, at 280 nm, as described previously.⁷ The amounts of RecU and its variants are expressed as moles of dimers; those of RuvB, as moles of hexamers. The HJs J1 and J3¹⁵ were assembled from four oligonucleotides (80 nt in length), one of which was radiolabeled. The $K_{d,app}$ was estimated by titrating the protein [P] against a very small amount of DNA [D]. The half-maximal point from the resulting curve is equal to the $K_{d,app}$ since [PD]=[D] at 50% saturation of DNA. We deduced that $K_{d,app}=[P]$. This simplification is only true if the DNA concentration is $<K_{d,app}$. (a) [γ -³²P]HJ J1 DNA (0.1 μM as moles of nt) was incubated with RecU (0.12, 0.25, 0.50, 1, 2, 4 or 8 to 16 nM), RecU Δ 1–32 (0.12 to 32 nM) or RecUR31A (0.25 to 32 nM) in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine serum albumin, 1 mM DTT and 5% glycerol) containing 1 mM MgCl₂ for 15 min, and complexes were separated by 6% nPAGE and autoradiographed. FD, free DNA; C₁ and C₂, protein·DNA complexes with different mobility levels. (b) Cleavage activity of RecU variants in the presence of RuvB. [γ -³²P]HJ J3

(0.1 μM in nt; the labeled strand 2 is denoted by an asterisk) was incubated with RecU variants (100 nM) and RuvB (40 nM) in buffer A containing 10 mM MgCl₂ and 1 mM ATP γ S for 30 min at 37 °C, and the cleavage products were analyzed by 15% denaturing PAGE and autoradiographed. (c) RecU Δ 1–32 forms an unstable complex with an HJ. [γ -³²P]HJ J1 DNA (0.1 μM in nt) was incubated with RecU, RecUR31A or RecU Δ 1–32 (20 nM) in buffer A containing 1 mM MgCl₂ for 2 min at 37 °C. Addition of a 50-fold excess of unlabeled non-specific DNA in 180 μl of buffer A with 1 mM MgCl₂ (the reaction diluted 10-fold) defined time zero. Samples were taken at various time points, the reaction mixtures were filtered on alkali-treated filters (Millipore, type HAWP, 0.45 μm)¹⁶ and the amount of DNA was retained on the filter quantified.

that the “stability” of RecUΔ1–32 is reduced markedly compared with the WT RecU protein. Expression of RecUR31A was also examined. The relative quantity of RecUR31A (*recU31* gene read from its native promoter) was approximately 2-fold less than that of RecU, although its half-life was equivalent to that of RecU (Fig. S1a and b).

Expressions of *ruvA* and *ruvB* are induced following DNA damage by mitomycin C (MMC) addition as part of the SOS response.¹⁴ RecU expression, from exponentially growing WT cells, was unaffected by MMC exposure (Fig. 2d), consistent with its independence from the SOS regulon. Similarly, RPU was not synthesized *in vivo* upon SOS induction as judged by the absence of a polypeptide co-migrating with the RecUΔ1–32 protein. The results fit with the observation that RecU, similar to RuvC_{Ecor}² is not subject to SOS regulation.

RecUΔ1–32 fails to cleave HJs, and RuvB does not stimulate HJ cleavage by RecUR31A

To analyze the defect observed in *recU31* and *recUΔ1–32* cells, we purified both proteins to near-homogeneity using a purification protocol similar to that for WT RecU. The dimeric states of mutant RecUΔ1–32 and RecUR31A were confirmed by protein cross-linking (Fig. S2) and gel-filtration chromatography (data not shown), as previously described for WT RecU.^{6,8}

RecU binds with high affinity to HJ DNA, and the protein concentration necessary to achieve half-saturation, 0.6 ± 0.2 nM, was considered as the apparent binding constant ($K_{d,app}$) (Fig. 3a).^{5–7} Both RecU mutant variants bound the HJ substrate, with a similar affinity as that for WT RecU ($K_{d,app}$ for RecUΔ1–32 and RecUR31A was 0.8 ± 0.2 nM) (Fig. 3a).

RecU resolves HJs by pairwise incisions across the branch point and requires specific sequence signatures for maximal activity.^{6–8} The RecUR31A mutant cleaved the HJ with similar efficiency as WT RecU (Fig. 3b) and generated a similar pattern of products with the different HJs tested. Surprisingly, the RecUΔ1–32 protein failed to cleave the HJ substrate (Fig. 3b) despite its capacity to bind HJs (Fig. 3a) with affinity similar to the WT protein.

Previously, it was shown that a specific interaction between RecU and RuvB, in the presence of ATPγS (RuvB·ATPγS·Mg²⁺), stimulates RecU cleavage of HJs, a step that is essential to connect branch migration with resolution of the HJ.⁵ In the presence of ATPγS·Mg²⁺, RuvB stimulated resolution of HJs by RecU but failed to stimulate HJ cleavage by RecUR31A (Fig. 3b). The results suggest that the interaction between RecUR31A and RuvB is impaired by the R31A mutation. Consistent with this, RecUR31A showed a three- to fivefold reduction in RuvB binding compared with WT RecU in protein cross-linking experiments (Fig. S3). It seems likely that RecUR31A cannot effectively associate with RuvB·ATPγS·Mg²⁺ on HJ DNA.

RecUΔ1–32 forms unstable complexes with HJs

In the absence of Mg²⁺, the HJ adopts a square planar geometry, while with Mg²⁺, the HJ folds by pairwise coaxial stacking of arms to form a stacked-X arrangement.³ Before cleavage, RecU-Mg²⁺ needs to distort the stacked conformation to give an open square planar structure.⁸ This change in conformation can be distinguished by comparative native PAGE (nPAGE) using six HJ species derived from different restriction digests of HJ J1 (Fig. S4). In the presence of Mg²⁺ ions, RecU, RecUΔ1–32 and RecUR31A impose an approximately square planar conformation on the junction, a situation akin to the free HJ in the absence of metal ions (Fig. S4). These results match those obtained previously for the WT RecU protein.⁸

The results suggest that there is no gross distortion in the overall structure of RecUΔ1–32 since the truncated protein binds and alters HJ conformation with similar efficiency as the WT RecU. However, the lack of a flexible N-terminus in RecUΔ1–32 could impair the catalytic center by affecting the binding stability necessary for cleavage, the thermal stability of the protein or a combination of these factors. If RecUΔ1–32 does indeed form less stable complexes with HJ DNA, then this defect may not be detected in the assays conducted in Fig. 3a, where stabilization due to the cage effect of nPAGE could occur. To explore this possibility, we measured protein·HJ complex stability in filter-binding assays in the presence of a large excess of unlabeled DNA. The amount of RecUΔ1–32·HJ complex retained in the filter decreased rapidly in this experiment, consistent with a half-life of less than 2 min (Fig. 3c). In contrast, the half-lives of the RecUR31A·HJ and RecU·HJ complexes were >16 min under the same conditions (Fig. 3c). It is likely that the dramatic reduction in RecUΔ1–32·HJ complex stability is largely responsible for the inability of this protein to cleave HJs (Fig. 3b).

RecUΔ1–32 and RecUR31A binding to ssDNA and dsDNA

Although RecU displays specificity for HJ DNA, it binds to other DNA substrates, such as three-stranded dsDNA (YJ), ssDNA and double-stranded DNA (dsDNA), with significantly reduced affinity ($K_{d,app}$ of ~200 nM; Table 2). Binding of the two mutant RecU proteins to these three DNA substrates

Table 2. RecUR31A and RecUΔ1–32 binding to different DNA substrates

Protein	HJ	YJ	dsDNA	ssDNA
RecU	0.6	100	200	200
RecUΔ1–32	0.8	200	300	300
RecUR31A	0.8	200	50	100

The $K_{d,app}$ values (in nanomolar) are the average of at least three independent experiments. Proteins were incubated with the indicated substrate⁶ for 15 min at 37 °C in buffer A containing 1 mM MgCl₂. Samples were separated by nPAGE, and formation of protein·DNA complexes was quantified as described previously.⁶

was assessed. RecUR31A bound to ssDNA and YJ almost as well as the WT protein and formed complexes with dsDNA considerably better (an approximately fourfold increased affinity). This feature could presumably reduce HJ specificity *in vivo*. In contrast, RecU Δ 1–32 bound each of these substrates with slightly reduced affinity than WT RecU (Table 2).

RecUR31A and RecU Δ 1–32 catalyze strand annealing and inhibit deoxy-ATP-dependent RecA-mediated DNA strand exchange

RecU catalyzes strand annealing and inhibits RecA-mediated DNA strand exchange.^{6,7} The effect of RecUR31A and RecU Δ 1–32 proteins on DNA

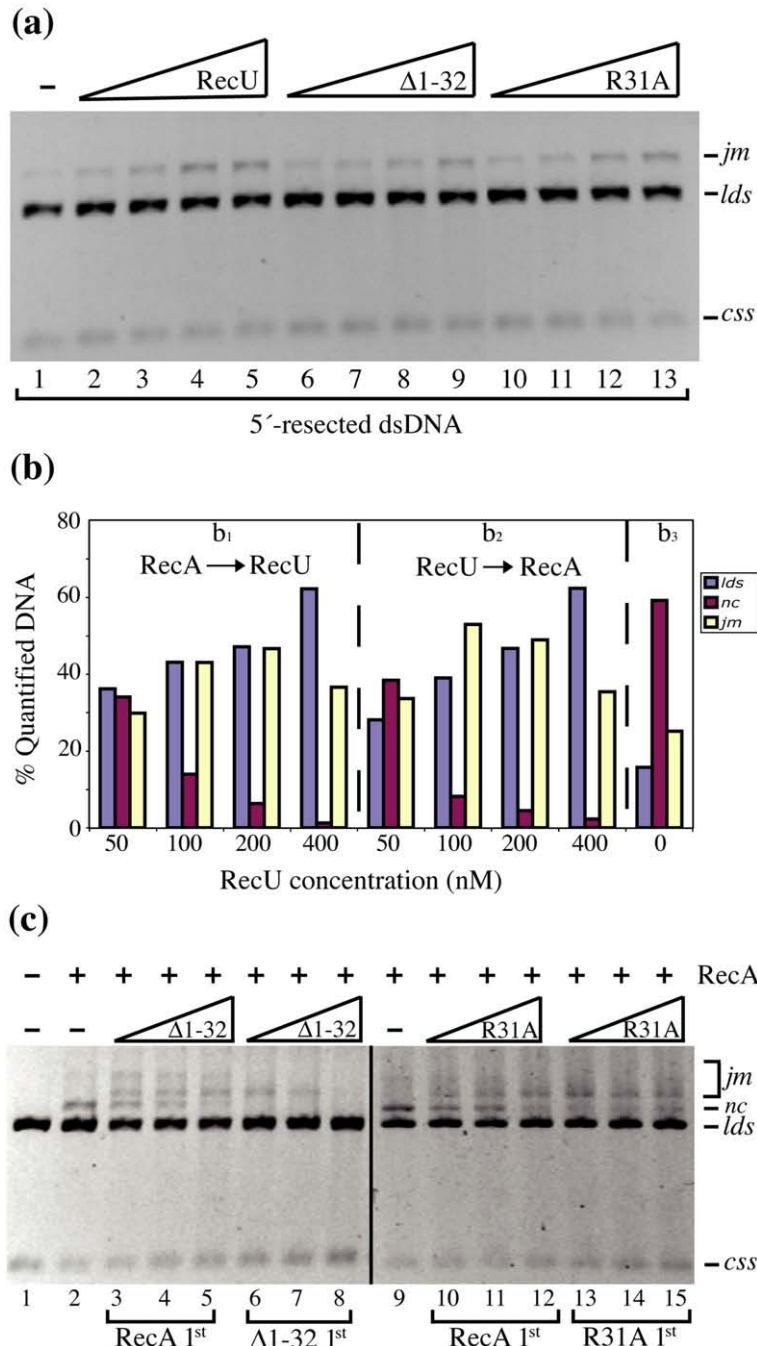


Fig. 4. Effects of RecUR31A and RecU Δ 1–32 on strand annealing and on RecA-mediated DNA strand exchange. RecA was purified to greater than 98% homogeneity; the molar extinction coefficient for RecA was calculated to be $15,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm, and RecA concentration is expressed as moles of protein monomers. Strand-exchange and annealing reactions were performed essentially as described previously⁷ using a KpnI-linearized pGEM3Z-f(+) substrate (KpnI-dsDNA) and a linear duplex with 3'-ssDNA termini of greater than 150 nt (5'-resected dsDNA) obtained by partial digestion of pGEM3Z-f(+) using exonuclease VII as described previously.¹⁷ (a) Circular ssDNA (10 μM in nt) and homologous 5'-resected dsDNA (20 μM in nt) were incubated with either RecU or its variants (50, 100, 200 or 400 nM) in buffer A containing 10 mM MgOAc₂ and 2 mM deoxy-ATP for 60 min at 37 °C. The products of the reaction were deproteinized and separated by 0.8% AGE with ethidium bromide. (b) Circular ssDNA (10 μM in nt) and homologous KpnI-dsDNA (20 μM in nucleotides) were incubated either with a constant amount of RecA (1.3 μM , b_1) or with a variable amount of RecU (400 nM, b_2) for 20 min at 37 °C. Variable RecU concentrations (b_1) or a constant amount of RecA (1.3 μM , b_2) was then added, and the reaction mixture was incubated for a further 40 min at 37 °C. In (b_3), the reaction was performed with only RecA for the total time (60 min) as a control. The products of the strand-exchange reaction were deproteinized and separated by 0.8% AGE with ethidium bromide and quantified as follows: accumulation of recombination intermediate (*jm*), yellow bars; final recombination products (*nc*), purple bars; and the presence of the recombination substrate (*lds*), magenta bars. (c) Effects of RecUR31A and RecU Δ 1–32 on RecA-mediated DNA strand exchange: Circular ssDNA and homologous linear KpnI-dsDNA were preincubated with a constant amount of RecA (1.3 μM , lanes 3–5 and 10–12) or variable amounts (50–400 nM) of RecU Δ 1–32 (lanes 6–8) or RecUR31A (lanes 13–15) in buffer A containing 10 mM MgOAc₂ and 2 mM deoxy-ATP for 20 min at 37 °C. Variable RecU Δ 1–32 (lanes 3–5) or RecUR31A (lanes 10–12) concentrations (50–400 nM) or a constant amount of RecA (1.3 μM , lanes 6–8 and 13–15) was then added, and the reaction mixture incubated for a further 40 min at 37 °C. The products of the strand-exchange reaction were separated as mentioned above. The abbreviations are as follows: C, partially nicked dsDNA; *css*, circular ssDNA; *lds*, linear dsDNA (KpnI-dsDNA or 5'-resected dsDNA); *nc*, nicked circular DNA; *ccc*, covalently closed circular DNA. All experiments were performed at least three times.

strand annealing was investigated. RecU (one dimer per 50 nucleotides) promotes the accumulation of joint molecules (jm's, ~25% of total molecules) between linear 5'-resected dsDNA and circular ssDNA in the presence (Fig. 4a, lanes 2–5) or in the absence of 2 mM deoxy-ATP.^{6,7} Similar results were observed when RecU was replaced either by RecUΔ1–32 or by RecUR31A (Fig. 4a, lanes 6–9 and 10–13, respectively). However, RecU fails to promote the accumulation of jm's between circular ssDNA and homologous linear dsDNA.⁶ Similarly, RecUR31A and RecUΔ1–32 failed to promote the accumulation of jm's between linear dsDNA and homologous circular ssDNA (data not shown).

The effects of RecUR31A and RecUΔ1–32 proteins on RecA-mediated DNA strand exchange were also investigated. RecA-mediated deoxy-ATP-dependent DNA strand exchange proceeds efficiently in the absence of SsbA protein,¹⁸ such that in a three-strand reaction, recombination intermediates, jm's, are formed early, with final products, nicked circular DNA (45%–55% of total DNA), emerging later^{7,18} (Fig. 4b₃). Independent of the order of addition, one RecU dimer per 100 nucleotides inhibited RecA-mediated DNA strand exchange between circular ssDNA and homologous linear dsDNA (Fig. 4b₁ and b₂) or linear 5'-resected duplex DNA.^{6,7} Similarly, independent of the order of addition, accumulation of RecA-mediated nicked circular products between circular ssDNA and homologous linear dsDNA was inhibited, even at low concentrations of RecUΔ1–32 or RecUR31A (one dimer per 100 nucleotides; Fig. 4c). Similar results were obtained with RecA-mediated DNA strand exchange between circular ssDNA and 5'-resected dsDNA (Fig. S5). In this case, however, accumulation of jm's mediated by RecUΔ1–32 or RecUR31A was unaffected (Fig. S5). It is therefore likely that the RecU variants are proficient both in strand annealing and in exerting a negative effect in RecA-mediated DNA strand exchange.

Conclusions

From the results described here, we propose that the active RecU resolving enzyme is a dimer, with each of its subunits consisting of a polypeptide chain of 206 amino acids. RecU contains a flexible N-terminus (residues 1–33) together with a stalk (residues 56–89) and a mushroom-like cap (residues 34–55 and 90–206), with the catalytic center (residues 36, 88, 101 and 103) located at the dimer interface.⁸ It has been suggested that the two uncleaved arms of the HJ are positioned such that they interact with the disordered 33-residue N-terminal region of RecU, including the highly conserved NRGGM motif (residues 30–33). At present, the structure of the flexible N-termini is not known; however, it may be that R31, located within the highly conserved NRGGM tetrad, functions directly or indirectly in RuvB binding. Indeed, RecUR31A displays almost all the activities associated with WT RecU protein, except that RuvB·ATPγS·Mg²⁺ fails to stimulate RecUR31A

cleavage of HJs. The position of the mutation in RecUR31A, its genetic properties and impairment of the RuvB–RecU interaction suggest that the deficiency affects a step as demanding as the HJ resolution reaction itself. This would be consistent with data showing that the RecU co-localization with RecN-promoted repair centers was a RuvB-dependent event.¹⁹

In vitro evidence suggests that RecUΔ1–32 binds and distorts HJs, promotes the formation of jm's and exerts a negative effect in RecA-mediated strand exchange yet is unable to cleave HJs. The reduced *in vitro* half-life of RecUΔ1–32 bound to an HJ is consistent with this region being important for stabilizing protein·protein and/or protein·DNA interactions.

Based on the results described here, we propose a single RecU superfamily, albeit with variable N-terminal extensions. We suggest that the misleading terms *RPU* and *PrfA* should be discarded. In the latter instance, this is especially important since the *prfA* gene encodes polypeptide release factor 1 in γ-proteobacteria and is a global transcriptional regulator in many species of the *Firmicutes* phylum.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI) through grants BFU2006-01062 and BFU2009-07167 (to J.C.A.) and BFU2006-02907 and BFU2009-09520 (to S.A.). Work by G.J.S. was supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. B.C. was supported by a Juan de la Cierva grant (MCI), and C.C. was a recipient of an MCI Fellowship (BFU2006-01062).

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2009.04.065](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.065)

References

- McGlynn, P. & Lloyd, R. G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 859–870.
- West, S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 213–244.
- Declais, A. C. & Lilley, D. M. (2008). New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 86–95.
- van Gool, A. J., Shah, R., Mezard, C. & West, S. C. (1998). Functional interactions between the Holliday junction resolvase and the branch migration motor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**, 1838–1845.

5. Cañas, C., Carrasco, B., Ayora, S. & Alonso, J. C. (2008). The RecU Holliday junction resolvase acts at early stages of homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5242–5249.
6. Ayora, S., Carrasco, B., Doncel, E., Lurz, R. & Alonso, J. C. (2004). *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 452–457.
7. Carrasco, B., Ayora, S., Lurz, R. & Alonso, J. C. (2005). *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3942–3952.
8. McGregor, N., Ayora, S., Sedelnikova, S., Carrasco, B., Alonso, J. C., Thaw, P. & Rafferty, J. (2005). The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure*, **13**, 1341–1351.
9. Fernandez, S., Sorokin, A. & Alonso, J. C. (1998). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of *recU* and *recS* mutations on DNA repair and homologous recombination. *J. Bacteriol.* **180**, 3405–3409.
10. Alonso, J. C., Tailor, R. H. & Luder, G. (1988). Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 3001–3007.
11. Carrasco, B., Cozar, M. C., Lurz, R., Alonso, J. C. & Ayora, S. (2004). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.* **186**, 5557–5566.
12. Sanchez, H., Kidane, D., Reed, P., Curtis, F. A., Cozar, M. C., Graumann, P. L. *et al.* (2005). The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics*, **171**, 873–883.
13. Eiamphungporn, W. & Helmann, J. D. (2008). The *Bacillus subtilis* σ^M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol. Microbiol.* **67**, 830–848.
14. Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L. E., Canny, S. P., Chachu, K. *et al.* (2005). Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J. Bacteriol.* **187**, 7655–7666.
15. Kvaratskhelia, M. & White, M. F. (2000). An archaeal Holliday junction resolving enzyme from *Sulfolobus solfataricus* exhibits unique properties. *J. Mol. Biol.* **295**, 193–202.
16. Alonso, J. C., Stiege, A. C., Dobrinski, B. & Lurz, R. (1993). Purification and properties of the RecR protein from *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **268**, 1424–1429.
17. Ayora, S., Missich, R., Mesa, P., Lurz, R., Yang, S., Egelman, E. H. & Alonso, J. C. (2002). Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J. Biol. Chem.* **277**, 35969–35979.
18. Carrasco, B., Manfredi, C., Ayora, S. & Alonso, J. C. (2008). *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst.)*, **7**, 990–996.
19. Kidane, D., Sanchez, H., Alonso, J. C. & Graumann, P. L. (2004). Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Mol. Microbiol.* **52**, 1627–1639.

Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*

Silvia Ayora, Begoña Carrasco, Paula P. Cárdenas, Carolina E. César, Cristina Cañas, Tribhuwan Yadav, Chiara Marchisone & Juan C. Alonso

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, Madrid, Spain

Correspondence: Juan C. Alonso,
Departamento de Biotecnología Microbiana,
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC,
Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid,
Spain. Tel.: +34 91 585 4546; fax: +34 91
585 4506; e-mail: jcalonso@cnb.csic.es

Received 21 October 2010; revised 10 March
2011; accepted 31 March 2011.

DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00272.x

Editor: Martin Kupiec

Keywords

double-strand break; recombination functions;
protein–protein interaction; protein
localization; endprocessing; NHEJ.

Abstract

In all living organisms, the response to double-strand breaks (DSBs) is critical for the maintenance of chromosome integrity. Homologous recombination (HR), which utilizes a homologous template to prime DNA synthesis and to restore genetic information lost at the DNA break site, is a complex multistep response. In *Bacillus subtilis*, this response can be subdivided into five general acts: (1) recognition of the break site(s) and formation of a repair center (RC), which enables cells to commit to HR; (2) end-processing of the broken end(s) by different avenues to generate a 3'-tailed duplex and RecN-mediated DSB 'coordination'; (3) loading of RecA onto single-strand DNA at the RecN-induced RC and concomitant DNA strand exchange; (4) branch migration and resolution, or dissolution, of the recombination intermediates, and replication restart, followed by (5) disassembly of the recombination apparatus formed at the dynamic RC and segregation of sister chromosomes. When HR is impaired or an intact homologous template is not available, error-prone nonhomologous end-joining directly rejoins the two broken ends by ligation. In this review, we examine the functions that are known to contribute to DNA DSB repair in *B. subtilis*, and compare their properties with those of other bacterial phyla.

Introduction

Faithful replication and maintenance of chromosome integrity and genetic variation are opposite forces that shape evolution. Genomes face constant challenges that can lead to DNA damage, from the intracellular genotoxic stress that arises as a result of normal cellular metabolism (e.g. free radicals, DNA replication errors) to a wide range of exogenous sources [e.g. ionizing radiation (IR), etc.]. DNA damage, which does not compromise nucleoid integrity, is removed by a set of dedicated error-free pathways (e.g. base excision repair, nucleotide excision repair, mismatch repair, etc.), each one specific for a given type or a group of lesions. These pathways have been reviewed previously (Sancar & Reardon, 2004; Friedberg *et al.*, 2006; Iyer *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007a; Ambur *et al.*, 2009) and are beyond the scope of this review.

Chromosome replication is not a continuous process; it can be impaired by obstacles (as DNA-bound proteins) by 'inactivation' of a replication protein and/or by the presence of unrepaired DNA lesions or abortive repair of DNA by the dedicated error-free pathways (reviewed by Mirkin & Mir-

kin, 2007). Replication arrest can have dramatic consequences and replication defects are now recognized as a major source of genomic instability (Kuzminov, 1999; Cromie & Leach, 2000; Michel *et al.*, 2004; Wyman *et al.*, 2004; Kreuzer, 2005; Aguilera & Gomez-Gonzalez, 2008; Branzei & Foiani, 2008). Homologous recombination (HR) plays a central role in the re-establishment of these stalled or collapsed replication forks. In bacteria, DNA damage that does not compromise nucleoid integrity leads to replication fork stalling, which triggers the synthesis of a set of DnaA-, LexA- and RecA-dependent genes involved in DNA repair and metabolism, and increases the repair of single-strand (ss) DNA gaps via HR. RecA-mediated daughter-strand gap repair and DNA replication restart, which was one of the first proposed mechanisms for recombinational DNA repair in *Escherichia coli* (known as postreplication repair), has been reviewed recently and will not be discussed further (see Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999; Cox *et al.*, 2000; McGlynn & Lloyd, 2002a,b; Courcelle & Hanawalt, 2003; Mariani, 2004; Michel *et al.*, 2004; Kreuzer, 2005; Persky & Lovett, 2008). Those ssDNA gaps that fail to be repaired are ultimately converted into one-ended double strand breaks

(DSBs) (Kuzminov, 1999; Cromie & Leach, 2000; Michel *et al.*, 2004; Wyman *et al.*, 2004; Kreuzer, 2005).

Different models have been proposed to explain how one-ended DSBs are generated and repaired in *E. coli* cells (Kuzminov, 1999; McGlynn & Lloyd, 2002b; Michel *et al.*, 2007; Persky & Lovett, 2008). These proposals cannot be easily extrapolated to other bacteria, because the phenotypes observed in cells lacking some of the protein factors involved vary between different bacteria and are in some cases contradictory. Conspicuously, while the absence of both branch migration translocases, RecG and RuvAB, is synthetically lethal in *Neisseria gonorrhoeae* (representative of *Betaproteobacteria* class) or *Bacillus subtilis* (*Firmicutes* phylum) (Sanchez *et al.*, 2005, 2007b, c; Sechman *et al.*, 2006), it shows a synergistic defect in DNA repair in *E. coli* cells (*Gammaproteobacteria* class), but leads to a wild-type (wt)-like phenotype in *Helicobacter pylori* cells (*Epsilonproteobacteria* class) (Kang & Blaser, 2008; Rudolph *et al.*, 2010). Inactivation of *H. pylori* RecG (RecG_{Hpy}), which does not show a significant defect in DNA repair, suppresses the recombination defect of the *ruvB*_{Hpy} mutations (Kang & Blaser, 2008), which suggests that in this bacterium, they may have opposing functions. This review is aimed at comparing the mechanisms used by bacteria to repair DSBs. In particular, it will focus on the recent cytological and biochemical information of HR proteins from *Firmicutes*.

Faithful repair of DSBs requires the recognition and processing of DSB ends and the interaction with an intact homologous DNA to produce genetic recombinants. The repair of one- and two-ended DSBs differs in the number of ends recruited into the repair reaction. The repair of multi-ended DSBs generated upon high doses of IR might follow a different and specialized avenue and hence it will be analyzed separately. To define a global bacterial response to DNA damage and the role of recombination proteins in one- or two-ended DSB repair, a search for the panrecombinosome, defined as a full and minimum set of genes required for recombinational DNA repair, and recombination-dependent replication restart, was undertaken. No panrecombinosome has been identified to date, in any reciprocal pairwise analyses, from > 900 different bacterial genomes sequenced (identity cutoff of ~25%, which is sufficient to indicate a structural homology; Sander & Schneider, 1991). A minimal bacterial panrecombination machinery emerges (Table 1) when endosymbiotic species are removed from the analysis and recombination functions are grouped into three distinct categories: those involved in the presentation and generation of the DNA substrate (presynapsis), the ones involved in the formation of heteroduplex DNA intermediates performed by the recombinase and its modulation (synapsis) and those involved in the generation of matured recombinant products (postsynapsis) (Table 1). Remarkably, this machinery is also conserved in large double-strand

Table 1. Panrecombinosome for DSB repair in bacteria and bacteriophages

Recombination stage	Bacterial products	Viral products
Presynaptic	RecN, PNPase, 5' → 3' Exo* (AddAB-like or RecJ-RecQ-like or RecJ-UvrD-like), SSB/SsbA	5' → 3' Exo [†] , Ssb-like
Synaptic	RecO, RecR, RecA, PcrA/UvrD	Synaptase (UvsX, SSAP)
Postsynaptic	RuvAB, RecG, HJ resolvase	HJ Resolvase (e.g. RusA)

*A 5' → 3' exonuclease-helicase as the members of the AddAB-like family: AddA-AddB (AddAB), RecB-RecC-RecD (RecBCD) or AdnA-AdnB (AdnAB) (see Rigden, 2005; Unciuleac & Shuman, 2010) or a 5' → 3' ssDNA exonuclease in concert with a DNA helicase (as RecJ in concert with a RecQ- or a UvrD-like helicase) (see text).

The dash denotes the concerted action of more than one product, and forward slash equivalent functions.

[†]A 5' → 3' exonuclease (Exo-like), as phage λ-encoded Redα exonuclease, that is specialized to work in concert with a recombinase (e.g. Redβ). There are two different classes of synaptases (recombinase), the ATP-dependent synaptases (e.g. bacterial RecA or T4-encoded UvsX) and the ATP-independent single-strand annealing protein (SSAP), as phage λ-encoded Redβ, and their mediators/modulators. The HJ resolvases either have an endonuclease-like fold (as *Bacillus subtilis* RecU or T7 Endo I), an RNaseH-like (*Escherichia coli* RuvC), a RusA-like or an HNH endonuclease fold (as T4 Endo VII) (Lilley & White, 2000; Sharples, 2001; Declais & Lilley, 2008).

(ds) DNA viruses (Table 1). Such a broad distribution of recombination functions could result as a consequence of lateral gene transmission, perhaps involving bacterial viruses. For example, bacteria of the *Firmicutes* phylum, the earliest-branching bacterial phyla (Ciccarelli *et al.*, 2006), encode a Holliday junction (HJ) resolvase of the RecU type, which belongs to the same superfamily as archaeal Hjc or virus T7 Endo I (with a PvuII-like fold), while non-*Firmicutes* bacteria encode a functional analogue, the RuvC type enzyme (with an RNase H fold) (Declais & Lilley, 2008; Ayora *et al.*, 2011). However, despite the structural difference, *B. subtilis* RecU can complement the defect of *E. coli* *ruvC* (*ruvC*_{Eco}) cells (Sanchez *et al.*, 2005, Table 1).

In *E. coli*, which is considered the bacterial paradigm for the analysis of DNA repair via HR, mechanisms of daughter strand gap and DSBs repair and the re-establishment of the replication fork have been reviewed extensively (Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999; Cox *et al.*, 2000; Cromie & Leach, 2000; McGlynn & Lloyd, 2002b; Courcelle & Hanawalt, 2003; Mariani, 2004; Michel *et al.*, 2004; Kreuzer, 2005; Persky & Lovett, 2008). There is growing evidence, however, that not all bacteria use the same DNA repair functions or the same proteins to re-establish replication forks (Ambur *et al.*, 2009). Indeed, in some bacteria (e.g. *B. subtilis* and *Mycobacterium tuberculosis*), two-ended DSB repair relies

not only on error-free homology-directed HR but also on a simplified nonhomologous end-joining (NHEJ) mechanism (Bowater & Doherty, 2006; Pitcher *et al.*, 2007; Shuman & Glickman, 2007; Ayora *et al.*, 2011). We will discuss the different avenues that *B. subtilis* utilizes for the repair of DSB, comparing them with those of distantly related bacteria. Unless otherwise stated, the genes and products mentioned herein are of *B. subtilis* origin. The *E. coli* model will only be discussed when providing essential and different information. The comparison between the repair processes of evolutionary diverging bacteria may be particularly informative and will help us to identify the common repertoires of HR mechanisms in bacteria.

Different pathways vs. concerted action of functions during DSB repair in bacteria

A DSB is the most lethal type of DNA damage. In wt *E. coli* cells, DNA break processing and loading of RecA onto 3'-ssDNA ends is catalyzed mainly by the 'RecBCD pathway', while the 'RecF or RecFOR pathway' is normally required for daughter strand gap repair (Clark & Sandler, 1994; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999; Amundsen & Smith, 2003; Michel *et al.*, 2004). Such a division of labor between these pathways has considerably helped us to understand the DNA recombination mechanisms in *E. coli*, but such a simplified analysis cannot be assumed for other bacteria even of the same class. The *E. coli* RecFOR pathway can also process DSBs in a *recB recC* background upon activation by mutations on the SbcB and SbcCD nucleases (Clark & Sandler, 1994; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999; Amundsen & Smith, 2003; Michel *et al.*, 2004). In bacteria other than those of the *Gammaproteobacteria* class, avenues other than RecBCD play an active role in end processing. In fact, it has been shown that the SbcB (also termed ExoI, SbcB/ExoI) 3' → 5' ssDNA exonuclease is restricted to the *Gammaproteobacteria* and to some species of *Betaproteobacteria*, suggesting that RecFOR 'activation' through inactivation of SbcB/ExoI and SbcCD nucleases might not be a general requirement. Additionally, in some bacteria, the absence of the RecBCD pathway together with some RecFOR pathway factors (e.g. RecF) does not completely block DSB repair via HR (Rocha *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006), suggesting that other functions might perform this role. Hence, we favor a scenario where a highly complex multistep repair response is finely orchestrated towards different avenues by multiple redundant functions. They can be stimulated by factors such as the nature of the DNA substrate, the confinement of the homologous template and/or the number of chromosomal copies. Based on the data obtained in *B. subtilis*, this multistep repair response to DSBs can be arbitrarily divided into five distinct stages (Table 2): (1) recognition of DNA damage and increase of the local

concentration of 3'-ssDNA ends; (2) end processing, which in turn is subdivided into two further steps: first, basal processing of the DNA ends and putative licensing of diverse DNA repair avenues, and second, long-range processing to give rise to a 3'-tail, which is bound by RecA to produce a RecA-ssDNA filament; (3) RecA-mediated homology search of multiple DNA ends at once in a crowded intracellular milieu, to generate the displacement loop (D-loop) recombination intermediate, necessary for replication fork resumption; (4) strand exchange processing, which can pursue three different avenues: helicase-dependent branch migration and resolvase-dependent processing of single or double HJs; topoisomerase-dependent decatenation and synthesis-dependent strand annealing (SDSA); and (5) faithful segregation of chromosomes. Many functions involved in these stages are conserved from bacteria to humans (Table 2).

Functional relationship and mechanistic differences between bacterial HR proteins

Genetic screenings of *B. subtilis* mutants that show decreased survival in response to DNA-damaging agents and/or altered rates of genetic recombination have led to the identification of at least 40 nonessential and ~10 essential gene products involved in DSB repair and re-establishment of the replication fork. Recently, the conservation of these functions among different bacterial phyla has been reviewed (Ayora *et al.*, 2011). Although most DSB repair proteins in *B. subtilis* work exclusively in either HR or NHEJ, some participate in both pathways (Alonso *et al.*, 1988, 1991, 1993a,b; Ayora *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1997, 1998, 1999; Sanchez *et al.*, 2005, 2006, 2007b). In all free-living organisms, a dedicated recombinase (bacterial RecA, archaeal RadA or eukaryotic Rad51 or DMC1) catalyzes DNA strand invasion and strand exchange, as a central step in HR, making impossible the classification of the *recA* function into an epistatic group (see Fig. 1). Genes, other than *recA*, which are involved in HR, have been placed into 10 different epistatic groups. In addition, there are many essential (*pcrA*, *smc-scpA-scpB*, *ssbA*, *dnaB*, *dnaD*, *topA*, *gyrAB*, *parCE*, *hbs/hupAB*, etc.) and nonessential (*cbfA/yhaM*, *hldD*, *lrpC*, *mfd*, *mutS2*, *pnpA*, *priA*, *rarA*, *recD2*, *recK*, *polA*, *ripX-codV/xerCD/xerS*], *sms/radA*, *topB*, *ypcP*, etc.) genes involved in HR, which are still to be classified (Fig. 1).

The complexity of DSB repair in bacteria is such that a precise molecular mechanism cannot be proposed for all bacteria. Indeed, there are genes that are essential in a given bacterial class, but dispensable in other classes. For example, within the *Bacilli* class, albeit with some exceptions, there are two paralogues with 5' → 3' exonuclease activity, DNA polymerase I (DNAP I, *polA* gene) and YpcP (*ypcP*), whose absence leads to synthetic lethality (Fukushima *et al.*, 2007): in bacteria of the *Clostridia* class, only the *polA* gene is

Table 2. Proteins involved in DSB repair via HR

Recombination stages	Bacteria		Eukaryotes
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>H. sapiens</i>
(a) Damage recognition	RecN, PNPase?	RecN, PNPase	MRN-CtIP*
	–	SbcEF?	–
(b) End processing	RecBCD	AddAB	–
	–	–	BLM-EXO1
	RecQ-RecJ [†]	RecQ/S [‡] -RecJ	BLM-DNA2-TopoIII α -RMI1 [§]
	–	UvrD-like [¶] -RecJ	–
	SSB	SsbA	RPA
	–	SsbB	SSB1/2-INTS3-C9ORF80
DSB coordination	RecN, PNPase?	RecN, PNPase	MRN-CtIP
	SbcCD	SbcCD, SbcEF	–
	MukB?	SMC-ScpAB	SMC1-3-Scc1-3
	SSB	SsbA	RPA
(c) Recombinase loading	RecBCD	AddAB?	?
	RecOR	RecO (R?)	RAD52
	RecFOR	RecFOR	BRCA2/FANCD1
Recombinase	RecA	RecA	RAD51
Mediator/modulators proteins	RecFOR	RecFOR	RAD51BD-XRCC2
	RecFR	RecFR?	BRCA2/FANCD1
	?	HepA, YqhH?	RAD54-RAD54B
	DinI	–	?
	RecX	RecX	?
	UvrD	PcrA	SRS2
	–	RecU	RAD51C-XRCC3
(d) Replication fork re-establishment	PriAB-DnaT	PriA-DnaDB	?
	PriC-PriA or Rep	PriA, PrcA?	?
Branch migration and HJ resolution protein(s)	RecG	RecG	?
	RuvAB	RuvAB	RAD54
	RuvC	RecU	GEN1
	RecQ-Topo III	RecQ/S-Topo III?	BLM-TopoIII α -RMI1
	?	MutS2	MSH4-MSH5?
	–	–	MUS81-EME1
	–	–	SLX1-SLX4
(e) Chromosomal segregation	XerCD-FtsK	RipX-CodV-SpoIIIE/SftA	?

*In budding yeast, Mre11, Rad50 and Xrs2 (MRX) in concert with Sae2.

[†]In the *recBC sbcB sbcC* background, RecQ and RecJ are involved in end processing.

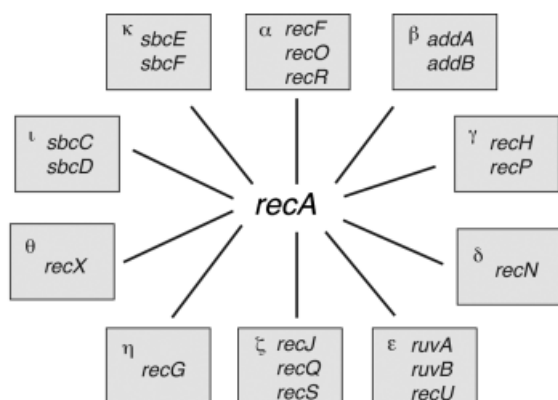
[‡]Any of the two RecQ-like helicases (RecS and RecQ) in concert with RecJ process DNA ends in an otherwise wt *B. subtilis* strain.

[§]The human equivalents to budding yeast functions Sgs1-Dna2-top3-Rmi1 [Correction added 26 May 2011 after online publication: 'fission' has been changed to 'budding' in this sentence]. A question mark denotes postulated or unknown activity. A dash denotes different components of a given complex. A forward slash denotes alternative proteins.

[¶]Any of the UvrD-like helicases (RecD2, PcrA/UvrD), in concert with RecJ, might process DNA ends.

found, while bacteria of the *Mollicutes* class encode only the *ypcP* gene. The homodimeric chromatin-binding protein Hbsu is essential among bacteria of the *Firmicutes* phylum, but the heterodimeric HU is nonessential within bacteria of the *Gammaproteobacteria* class (Fernández *et al.*, 1997). Additionally, an individual protein may have different biochemical activities in different bacterial genera. For example, RecR, of *Firmicutes* and *Deinococcus-Thermus* phyla, binds ssDNA and dsDNA (Alonso *et al.*, 1993a; Ayora *et al.*, 1997a, b; Lee *et al.*, 2004), but its *E. coli* counterpart fails to do so (Umezū & Kolodner, 1994; Webb *et al.*, 1995). There are mechanistic differences in the end-processing step

catalyzed by the AdnAB, AddAB or RecBCD helicase–nuclease complex (Niu *et al.*, 2009). Few bacteria, including those of the *Mycobacterium* genus, encode multiple copies of the multisubunit helicase–nuclease complexes, while obligate endosymbionts lack every component of the multisubunit helicase–nuclease complex (Montague *et al.*, 2009). Bacteria from different phyla encode a large RecD helicase, RecD2 (Rocha *et al.*, 2005), and a *recD2* mutation is non-epistatic with the *addA addB* mutations, at least in bacteria of the *Firmicutes* phylum (C. E. César and C. Marchisone, personal communication). Finally, there are several recombinational repair proteins that, although conserved, seem to



Unclassified: *pcrA*, *smc-scpA-scpB*, *ssbA*, *dnaB*, *dnaD*, *topA*, *gyrAB*, *parCE*, *hbs* (essential genes). *cbfA*, *helD*, *lprC*, *mfd*, *mutS2*, *pnpA*, *priA*, *rarA*, *recD2*, *recK*, *polA*, *ripX-codV*, *sms*, *topB*, *ypcP* (nonessential genes).

Fig. 1. Schematic grouping of *Bacillus subtilis* RecA-dependent DNA recombinational repair genes into different epistatic groups. Because a *recA* mutation is epistatic with any representative mutation in the different epistatic groups (α – κ), it was placed in the center. The set of as yet unclassified essential or nonessential genes also involved in RecA-dependent or RecA-independent DNA repair are presented.

play a different role in different bacterial classes. As an example, the absence of the Sms/RadA protein, which plays an unknown, but active role in the stabilization and/or processing of branched DNA molecules (Carrasco *et al.*, 2002, 2004), partially suppresses the DNA repair and segregation defect of *B. subtilis* *ruvAB* or *recG* cells (Carrasco *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007b). By contrast, in *E. coli* cells, a mutation in the *sms/radA* gene shows a strong synergism with mutations in *recG*, and to a lesser extent, with defects in *ruvA* and *ruvC*. Furthermore, the absence of Sms/RadA_{Eco} enhances the conjugative recombination deficiency conferred by mutations in *recG_{Eco}*, *ruvA_{Eco}* and *ruvC_{Eco}* (Beam *et al.*, 2002), whereas the absence of Sms/RadA in *Firmicutes* decreases the transformation frequency of otherwise wt cells (Carrasco *et al.*, 2002; Claverys *et al.*, 2009).

DNA damage response

DNA damage halts DNA replication and alters, in a DnaA-, LexA- and RecA-dependent manner, the expression of genes involved in DNA repair, among other processes, in order to increase the chances of survival (Sassanfar & Roberts, 1990; Messer, 2002; Friedberg *et al.*, 2006; Erill *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2010). Not all bacteria, however, respond to DNA damage in an identical manner. This induction of DNA repair can proceed by different regulatory networks or by a

combination of them, namely SOS response, oxidative stress, iron homeostasis, etc. (Courcelle *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Khil & Camerini-Otero, 2002; Sebastian *et al.*, 2002; Campoy *et al.*, 2003; Porwollik *et al.*, 2003; Grifantini *et al.*, 2004; Stohl *et al.*, 2005; Sweetman *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007; Jordan & Saunders, 2009). In some species of the *Betaproteobacteria* class (e.g. *N. gonorrhoeae*), the autoproteolysis of the LexA orthologue requires RecA in response to nonoxidative DNA damaging agents, but *recA* expression is not upregulated following treatment with different DNA damage-inducing agents (Schook *et al.*, 2011). Furthermore, LexA is absent in bacteria of the *Bacteroidetes* and *Chlorobi* phyla, in the *Epsilonproteobacteria* class and in some species of the *Bacilli* and *Mollicutes* classes (Erill *et al.*, 2007).

UV radiation generates ssDNA regions at stalled replication forks, to which RecA polymerizes, stimulating the LexA self-cleavage reaction that triggers the LexA-dependent response (Little, 1991; Cox, 2007b; Patel *et al.*, 2010). In *E. coli* or *B. subtilis*, cleavage of LexA, which acts as a transcriptional repressor, increases the expression of roughly 30–50 SOS genes, including the *recA* and *lexA* genes (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001; Khil & Camerini-Otero, 2002; Au *et al.*, 2005; Goranov *et al.*, 2006; Erill *et al.*, 2007). However, the genes induced are poorly or not conserved; from the primary recombinational repair genes, only *lexA* and *recA* gene induction is conserved among bacteria with a genuine SOS response (Erill *et al.*, 2007). The SOS response has a cost, because a second DNA molecule and LexA share the same binding site within the RecA filament so that SOS response induction competes with RecA-mediated recombination (Harmon *et al.*, 1996). These two RecA activities are indirectly regulated by ubiquitously present modulators (PcrA/UvrD, RecO, RecR, RecF and RecX) and by other less conserved ones (HelD, RecU, DinI and RdcC) that control the dynamics of the RecA·ssDNA filament (Cox, 2007a,b; Ayora *et al.*, 2011).

When a DNA lesion collapses the replication fork compromising the nucleoid integrity, the DNA ends are resected and RecA is loaded onto the SsbA-coated ssDNA tails, resulting in altered expression of > 500 genes in a RecA-dependent manner, from which < 50 are directly regulated by LexA both in *E. coli* and in *B. subtilis* (Khil & Camerini-Otero, 2002; Goranov *et al.*, 2006). Indeed, two-ended DSBs induced by IR cause a global SOS induction in virtually every *E. coli* cell, but only in a small fraction of *B. subtilis* cells (Simmons *et al.*, 2009). Unlike *E. coli* cells (Sargentini & Smith, 1986), *B. subtilis* cells incapable of inducing the SOS response have nearly wt levels of survival rate in response to IR (Simmons *et al.*, 2009). The roles of other stress-response transcriptional regulators, as the one recently described in *N. gonorrhoeae*, in the repair of DSBs are poorly characterized (Schook *et al.*, 2011).

Mechanisms of DNA DSBs repair

As we have already discussed, DSBs arise when a replication fork is collapsed (one-ended DSBs, Figs 2a and 3a) or directly through the action of DNA damaging agents, such as IR, that break the phosphate backbone, leading to two-ended (Figs 2b and 3b) or multiple-ended DSBs (McGlynn & Lloyd, 2002b; Courcelle & Hanawalt, 2003; Michel *et al.*, 2004; Wyman *et al.*, 2004). Both in eukaryotes and in prokaryotes, the information required for the repair of DSBs is readily available in the form of an intact homologous template (McGlynn & Lloyd, 2002b; Courcelle & Hanawalt, 2003; McEachern & Haber, 2006; Llorente *et al.*, 2008). To repair DSBs, the cell reacts by activating the synthesis and/or increasing the local concentration of recombination proteins, which are physically recruited to the DNA lesion site, in a step-wise manner. The recombination machinery has to bring the needed homologous sequence from the same DNA molecule (one-ended DSB) or from a different DNA mole-

cule (two-ended DSBs) (Kidane *et al.*, 2004; Lisby & Rothstein, 2004).

To understand the order of events during HR after DSB formation in bacteria, different experimental approaches have been adopted. These involve high-throughput methods to detect the functional, evolutionary and structural relationships between groups of interacting *E. coli* proteins (Su *et al.*, 2008), and high-throughput yeast two-hybrid screens, as those used with *Campylobacter jejuni* and *B. subtilis* species (Noirot & Noirot-Gros, 2004; Parrish *et al.*, 2007). To dissect how recombination and repair proteins are recruited and how they function at a DSB in living *B. subtilis* cells, genes involved in DNA repair were fused with a gene coding for a fluorescent protein (Lindow *et al.*, 2002; Mascarenhas *et al.*, 2002; Kidane *et al.*, 2004; Kidane & Graumann, 2005a; Sanchez *et al.*, 2005, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Lecointe *et al.*, 2007). The fully functional fused genes were used to replace the wt genes on their natural loci in order to examine the temporal order of

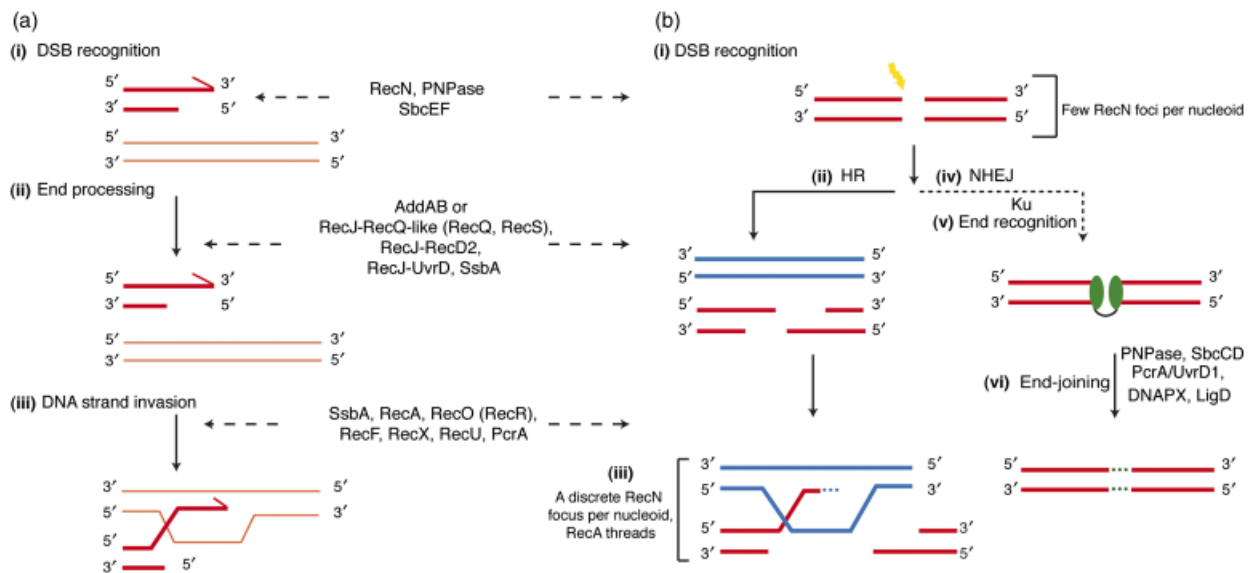


Fig. 2. Early steps of DSB repair in *Bacillus subtilis*. (a) A physical or a chemical agent introduces an ssDNA nick that collapses the replication fork, leading to one-ended DSB. This can be repaired by HR at all stages of the cell cycle. (i) The RecN protein, in concert with PNPase, recognizes damaged ends and promotes basal end processing. If the ends already have an ssDNA region, SsbA binds to them. A RecN 'backup system', SbcEF, is present in some bacteria. (ii) The long-range resection of the 5'-ends can be catalyzed by RecJ, in concert with a RecQ-like (RecQ or RecS) or a UvrD-like (PcrA, RecD2?) helicase, with SsbA/SSB stimulating the nuclease and helicase activities. Alternatively, long-range resection is performed by the AddAB nuclease-helicase complex (AdnAB, RecBCD), which, under some circumstances, might also load RecA directly onto naked ssDNA (e.g. RecBCD_{Eco}). (iii) RecO alone or the RecOR(F) complex promotes the disassembly of the SsbA protein and the loading of RecA onto SsbA-coated ssDNA. RecA-polymerized onto SsbA/SSB-coated ssDNA promotes the search for a homologous template. RecA modulators (RecF, RecX, PcrA/UvrD, RecU, etc.) control RecA by modulation of RecA filament extension. (b) A physical or a chemical agent (in yellow) introduces a two-ended DSB that can be repaired by HR at all stages of the cell cycle or by NHEJ that functions primarily if HR is impaired or during the stationary phase. (i) RecN, in concert with PNPase, recognizes damaged ends and tethers them, promoting commitment to HR. If the ends already have an ssDNA region, SsbA binds to them. Steps ii and iii are similar to one-ended DSB. (iv) In the absence of HR during vegetative growth or in the absence of a sister chromatid (stationary phase), the NHEJ system is activated. (v) Long-range resection is blocked and the DNA ends are tethered by the action of the homodimeric Ku protein (bridged green ovals). (vi) The ends are ligated by LigD or are processed before ligation by redundant pathways consisting of nucleases (SbcCD, PNPase or DNAPX) and a UvrD-like DNA helicase (PcrA). This step is performed by as yet poorly characterized functions. For simplicity, only the names of *B. subtilis* functions are described.

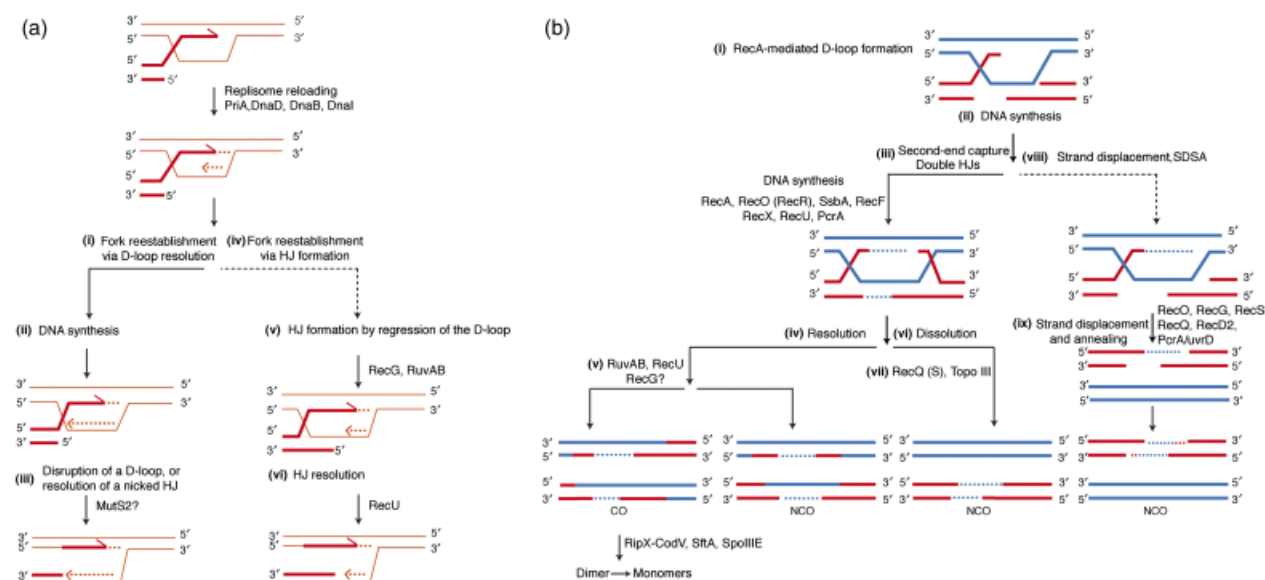


Fig. 3. Late steps of DSB repair in *Bacillus subtilis*. (a) Repair of one-ended DSBs. RecA-mediated strand invasion leads to the formation of a D-loop intermediate. The invading strand primes DNA synthesis using the intact homologous chromosome as a template to restore the lost genetic information. The replisome assembly machinery reloads the replicative helicase in the lagging strand template. In steps i–iii, replication continues up to encountering the invading strand forming an extended D-loop or a nicked HJ-like structure, which might be disrupted by MutS2 (absent in *Alpha*-, *Beta*- and *Gamma*proteobacteria) or any uncharacterized endonuclease. In steps iv–vi, by the action of a branch migration translocase (RecG or RuvAB), the D-loop is partially regressed to form a HJ intermediate that is resolved to a fork structure by RecU/RuvC. (b) Repair of two-ended DSBs. The steps i and ii are shared by one- and two-ended DSB repair. (iii–v) Capture of the second DNA end, derived from the other end of the DSB, by RecO (RecOR) leads to a double HJ that is branch migrated by RuvAB and resolved by RecU. The role of the RecG branch migration translocase in RecU-mediated resolution of HJs is poorly understood. Differential cleavage of the double HJs, gap filling and ligation leads to CO or NCO products. The unwanted dimers (CO products) are disentangled by SMC-Topo IV and converted into monomers by a tyrosine site-specific recombinase RipX-CodV in concert with one or two translocases (SpoIIIE or SftA). The double HJ formed in step iii could also be processed by a Topo III enzyme, in concert with a RecQ-like or a UvrD-like helicase and SsbA, by branch migration and strand decatenation that dissolve the double HJs, producing only NCO products. The 3'-invading end, extended by the replisome, can be displaced from the joint molecule and reannealed with the complementary strand of the other resected end of the break (steps viii and ix). This repair mechanism, which is termed SDSA, produces only NCO products. This putative avenue is poorly characterized in Bacteria. For simplicity, only the names of *B. subtilis* functions are described.

protein recruitment to discrete foci, after treatment with the DNA damaging agent mitomycin C (MMC) (Kidane *et al.*, 2004; Kidane & Graumann, 2005a; Sanchez *et al.*, 2005, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2010). In an alternative approach, the fused gene was expressed from an inducible promoter while the wt gene was expressed from its natural locus (Lindow *et al.*, 2002; Kidane & Graumann, 2005b; Simmons *et al.*, 2007). Not all protein fusions were informative. These cytological studies can be used to choreograph DSB repair into five acts in *B. subtilis*: (1) damage-induced RecN foci, which are dynamic structures typically containing a high local concentration of RecN at the broken DNA ends, recognize the broken ends that might modulate the initial response to DNA damage, (2) long range end-processing at the break (generation of 3'-ssDNA ends) and DSB 'coordination' to form a discrete repair center (RC), (3) loading of the strand exchange protein, RecA, onto the 3'-ssDNA ends at the RC (Fig. 2), (4) RuvAB-mediated loading of the RecU HJ resolvase and (5) disassembly of the recombination apparatus and replica-

tion restart (Fig. 3). From these defined steps, the recognition of the break site might be common for HR and NHEJ, followed by the commitment to DNA repair by HR, before end processing (Fig. 2b).

Break recognition and initial response to DNA DSBs

Different bacteria have a different number of SMC-like proteins; four are found in *B. subtilis* (SMC, SbcC, SbcE and RecN). The absence of either SbcC or SbcE renders cells sensitive and SMC or RecN very sensitive to MMC, H₂O₂ or IR, but moderately sensitive to UV radiation or 4-nitroquinoline (mimics UV damage), suggesting that they are mainly involved in DSB repair (Sargentini & Smith, 1986; Alonso *et al.*, 1993b; Funayama *et al.*, 1999; Dervyn *et al.*, 2004; Kidane *et al.*, 2004; Kosa *et al.*, 2004; Mascarenhas *et al.*, 2006; Stohl & Seifert, 2006; Guthlein *et al.*, 2008; Krishnamurthy *et al.*, 2010), and implying a central role for the RecN and SMC proteins and, to a lesser extent, for SbcC

and SbcE in DSB repair in bacteria. The phenotype varied between different bacterial species; for example *N. gonorrhoeae* cells are very sensitive to UV irradiation (Skaar et al., 2002), but *E. coli* *recN* cells are almost fully resistant to it (Picksley et al., 1984). Furthermore, the acute sensitivity of *E. coli* *recN* cells to bleomycin-induced DSBs was comparable to that of *recA*, implying a central role for the RecN protein in the repair of bleomycin lesions (Kosa et al., 2004).

Exponentially growing *B. subtilis* wt cells in minimal medium at 22 °C show one discrete SMC-YFP focus adjacent to the *oriC* in the large majority of the cells (~75%) and one SbcC-GFP or SbcE-YFP focus per nucleoid in ~2% or ~9% of cells, respectively, but RecN-YFP foci formation is rare (< 0.1% of the total cells) (Mascarenhas et al., 2002; Mascarenhas et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2010). However, exponentially growing *B. subtilis* *addA*, *recU* and *recA* cells accumulate RecN-YFP foci in ~2%, ~5% and ~30% of the total cells, respectively (Kidane et al., 2004; Sanchez et al., 2005, 2006), suggesting that in the absence of AddAB, RecU or RecA, the replication fork might be more susceptible to breakage, and consequently subjected to RecN recognition.

About 15 min after the generation of a site-specific DSB or random DSBs (after exposure to different doses of IR, nalidixic acid or MMC), nucleoids tend to fuse, with only ~4% of cells containing two nucleoids (~21% of exponentially growing cells contain two nucleoids). SMC-YFP, SbcC-GFP and SbcE-YFP remain unaltered, but RecN-YFP relocalizes from a diffuse distribution to a discrete focus (or RC) per nucleoid in ~35% of the total wt cells (Kidane et al., 2004; Mascarenhas et al., 2006; Shintomi & Hirano, 2007; Krishnamurthy et al., 2010). About 30 min after the addition of MMC, the SOS response is turned on (Sassanfar & Roberts, 1990; Messer, 2002; Friedberg et al., 2006; Erill et al., 2007; Patel et al., 2010), SMC-YFP retains its regular subcellular localization, the number of cells bearing SbcC-GFP or SbcE-YFP foci increases to ~5% and ~14% of the cells, respectively, and RecN-YFP is recruited into damage-induced foci in ~75% of cells (Kidane et al., 2004; Kidane & Graumann, 2005a).

In the current model, SMC, SbcC and SbcE play a role in the maintenance of chromatin structure in actively replicating wt cells. This is consistent with the observation that SbcC and SbcE interact with the DnaG primase, and SbcC_{Eco} with the replicase (Noirot & Noirot-Gros, 2004; Darmon et al., 2007), and with the fact that SMC is recruited to the region adjacent to *oriC* to enhance faithful segregation (Gruber & Errington, 2009). RecN, which is among the first responders to DSBs, senses the DNA damage and recruits multiple DNA ends to form a single RC, i.e. two or more two-ended DSBs, generated concurrently, diffuse to coexist in space and time. RecN, which works as a concentrator of 3'-ends, bound to each DSB, undergoes a 'large-scale mo-

tion' (DNA ends tethering) and works as a scaffold that loads repair proteins (Fig. 4).

Does RecN recognize stalled forks? A shift of *dnaA* or *dnaB* thermosensitive mutant strains to nonpermissive temperature causes stalling of the replication fork, and ultimately, replication fork collapse in a small fraction of cells (Graumann & Knust, 2009). Upon this temperature shift, only a fraction of the total cells (~15%) contain discrete RecN or RecA foci per nucleoid (Mascarenhas et al., 2006; Simmons et al., 2007; Krishnamurthy et al., 2010), whereas upon induction by MMC discrete RecN-YFP foci are observed in ~75% of the cells within the first 30 min, with RecA-GFP foci starting to accumulate in the 30–45-min interval (Kidane et al., 2004; Kidane & Graumann, 2005a). A possible explanation to reconcile this apparent contradiction is that a block in replication, generated by the inactivation of DnaA or DnaB, leads to replication fork stalling in the large majority of cells and perhaps to one-ended DSBs in a small fraction, with both RecN and RecA forming foci in ~15% of cells (Simmons et al., 2007). Both the inactivation of DnaA or DnaB and the addition of MMC cause discrete RecN-YFP foci, observed in ~75% of cells, and RecA foci in ~15% of cells within the first 30 min. DNA damage-induced RecA foci and threads form later (30–120 min; see Fig. 4) (Kidane & Graumann, 2005a; Sanchez et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2010). It is likely that when DNA replication is blocked and DNA DSBs are induced, two different DNA repair events (DNA gaps and DSBs) overlap and RecN recognizes DSBs rather than DNA gaps.

The confirmation that RecN specifically recognizes DSBs comes from experiments showing that RecN colocalizes with site-specific two-ended DSB induced at a specific region, close to *oriC* or *terC* (Kidane & Graumann, 2005a,b; Mascarenhas et al., 2006). Indeed, RecN assembles preferentially and directly at the site of a DSB upon induction of DNA damage, rather than at the replication factory, thus making RecN a very good marker for one- and two-ended DSB and the formation of RCs (Kidane & Graumann, 2005a).

Does a RecN backup system exist? SbcC and SbcE form foci in exponentially growing cells, and foci formation increases slightly upon MMC addition, the former colocalizing with the replication factory, but not the latter (Mascarenhas et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2010). However, DNA damage-induced SbcE foci were observed in 36% of *recN* or 26% of *sbcC* cells within 30 min, after MMC addition, when compared with 14% in wt cells (Krishnamurthy et al., 2010), suggesting that SbcE may work as a RecN or an SbcC backup system. Indeed, the *recN* and *sbcE* or *sbcC* and *sbcE* mutations are nonepistatic, but the role of the *Firmicutes* SbcCD and/or SbcEF complexes in HR remains to be characterized (Mascarenhas et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2010).

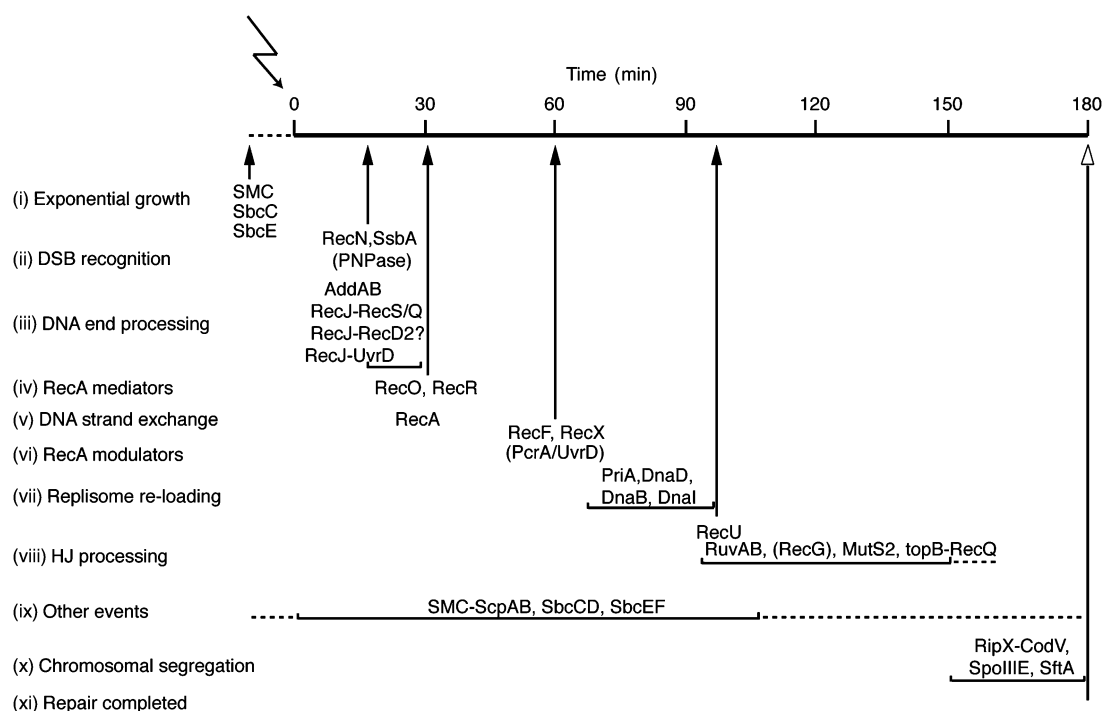


Fig. 4. Temporal order of protein assembly at DSBs in *Bacillus subtilis*. Chromosome replication is not a continuous process. SMC, SbcC and SbcE form discrete foci during exponential growth (stage i). Upon induction of random one- or two-ended DSBs or a single site-specific two-ended DSB (time 0), RecN acts as a sensor and, in concert with PNPase, assembles on DNA, forming few repair centers (RCs) (stage ii). After basal resection, the 5' ends are further resected either by the nuclease(s)–helicase(s) AddAB complex or by the RecJ ssDNA exonuclease, in concert with a RecQ-like (RecQ and/or RecS) or a UvrD-like DNA helicase (RecD2?, PcrA) in association with SsbA (stage iii). Stages ii and iii are closely related *in vivo*. The long-range end resection leads to SsbA binding and protection of the ssDNA and to RecN tethering of the DNA ends, leading to a discrete RC (15–30 min) and 'DSB coordination'. Stages iv–vi are visualized by the temporal RecO, RecR and RecA recruitment (30–45 min). These proteins are directly or indirectly recruited to the RecN-promoted RC. At a later stage, RecF (min 60, stage vi) is recruited to the RecN-mediated RC and RecX modulates RecA threads (as probably PcrA/UvrD). Replisome assembly via PriA, DnaD, DnaB and DnaI might take place during 60 and 90 min after DNA damage (stage vii). The recruitment of RecU to a recombination intermediate, in the presence of RuvAB, is visualized at min 100–110 after DNA damage (stage viii). Concomitant with stages ii–viii, other processes such as SMC maintenance of the chromosome condensation and SbcCD- and SbcEF-dependent repair take place (stage ix). Once DNA replication is ended and cell division begins, the RipX-CodV/XerCD/XerS tyrosine recombinase, in concert with SpoIIIA/FtsK or SftA, resolves the accumulated dimeric chromosomes (stage x). Growth resumption in minimal medium at 22 °C takes place ~180 min upon DNA damage in wt cells.

DSB recognition and the initial response to DNA damage are poorly characterized processes in other bacteria. In *E. coli*, the RecN concentration is very tightly regulated and is maintained at very low levels (Neher *et al.*, 2006) before SOS induction (Finch *et al.*, 1985; Courcelle *et al.*, 2001), suggesting that RecN_{Eco} cannot act before end-processing and SOS induction (Meddows *et al.*, 2005). Alternatively, RecN_{Eco} can be induced by other stress systems. Indeed, overexpressed GFP-RecN_{Eco} is found to localize in discrete foci on the nucleoid after the induction of DSBs by IR (Nagashima *et al.*, 2006).

Several differences also exist at the biochemical level. The insolubility of RecN_{Eco} has hampered the efforts to purify the protein and has limited the possibility to compare the role of RecN in DSB repair in the two distantly related *E. coli* and *B. subtilis* bacteria. *In vitro*, RecN and *Deinococcus radiodurans* RecN (RecN_{Dra}) hydrolyze ATP with similar turnover rates, and such rates are stimulated four- to sixfold

by DNA. The RecN ATPase activity is stimulated by ssDNA, whereas RecN_{Dra} rates are stimulated by dsDNA (Sanchez & Alonso, 2005; Reyes *et al.*, 2010). However, RecN of *Haemophilus influenzae* RecN (RecN_{Hin}) and *Aquifex aeolicus* (RecN_{Aae}) have a weak ATPase activity, but *Bacteriodes fragilis* (RecN_{Bfr}) fails to hydrolyze ATP (Grove *et al.*, 2009).

RecN_{Hin}, RecN_{Aae} and RecN_{Bfr} fail to bind DNA *in vitro* (Grove *et al.*, 2009). RecN binds to discrete ssDNA ends and tethers them to increase the local end concentration, leading to rosette-like structures formed by these protein·ssDNA complexes (Sanchez *et al.*, 2008), RecN_{Dra} performs a similar function on dsDNA (Reyes *et al.*, 2010). It is worth noting that RecA_{Dra} binds preferentially to dsDNA (Kim *et al.*, 2002), whereas RecA from other bacteria bind preferentially to ssDNA (Cox, 2007a; Galletto & Kowalczykowski, 2007). The preference of both RecA_{Dra} and RecN_{Dra} for dsDNA may be relevant for the accomplishment of DSB repair in *Deinococcus* (Kim *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2010).

Furthermore, the large RecN · ssDNA complexes are insensitive to SsbA, but disrupted by RecA (Sanchez & Alonso, 2005; Sanchez *et al.*, 2008). Genetic data, however, suggest that RecN_{Eco} protects ssDNA during conjugative recombination (Lloyd & Buckman, 1995) and RecN, RecN_{Ngo} or RecN_{Hpy} protects ssDNA during natural transformation (Lloyd & Buckman, 1995; Skaar *et al.*, 2002; Kidane & Graumann, 2005b; Wang & Maier, 2008; Kidane *et al.*, 2009). Indeed, RecN interaction with incoming ssDNA favors the localization of RecN at the pole containing the competence machinery (Kidane & Graumann, 2005b).

Two-ended DSB repair by HR or NHEJ

Archaea, eukaryotes and some bacteria have evolved two different avenues to repair two-ended DSBs: HR and NHEJ. These avenues are largely distinct from one another and function in a completely different way. HR is the predominant mechanism used by bacteria to repair one- or two-ended DSBs during the transient diploidy generated by replication, before cell division, or by natural diploids or polyploids as described in some free-living or symbiotic bacteria (Hansen, 1978; Kitten & Barbour, 1992; Komaki & Ishikawa, 1999; Tobiason & Seifert, 2006; Tobiason & Seifert, 2010). Some bacteria also have functions that allow them to repair two-ended DSBs via error-prone NHEJ. Commitment to NHEJ in bacteria is still a poorly understood process and its physiological importance remains to be addressed. In mammalian cells, 50–70% of the DSBs created by the I-SceI endonuclease are repaired by NHEJ, with the remaining fraction being repaired by HR (Liang *et al.*, 1998). Indeed, two-ended DSBs are repaired mainly by NHEJ during the M (G₀) and the G1 (G₁) phases, but when sister chromatids are adjacent, as in the S and G2 (G₂) phases, DSBs are actively repaired by HR (Pâques & Haber, 1999; Rothkamm *et al.*, 2003; Harper & Elledge, 2007; Aguilera & Gomez-Gonzalez, 2008; Huertas & Jackson, 2009; Mimitou & Symington, 2009a, b). Several lines of evidence suggest that end resection is needed for all HR processes in all living organisms, and resected DNA ends decrease NHEJ efficiency. DNA tethering by eukaryotic Rad50 or bacterial RecN and the recruitment of Rad51 or RecA mediators is also crucial in the commitment to HR, because end-processing and Rad51 or RecA loading are necessary for HR, but inhibitory for NHEJ (Aylon *et al.*, 2004; Ira *et al.*, 2004; Ayora *et al.*, 2011). In *B. subtilis* cells, two-ended DSBs created by random breaks or by site-specific incision through HO endonuclease are mainly repaired by HR (> 99.9%) (Bowater & Doherty, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2006; Cardenas *et al.*, 2009). However, in the presence of a single chromosome copy or when HR is impaired at early stages, a minor fraction of two-ended DSBs are repaired by NHEJ, utilizing little or no homology to ligate DNA ends (Bowater & Doherty, 2006;

Mascarenhas *et al.*, 2006; Shuman & Glickman, 2007; Cardenas *et al.*, 2009; Lieber, 2010). This is consistent with experiments showing that exponentially growing *B. subtilis* null *recA* mutants ($\Delta recA$) are extremely sensitive to DSB-inducing DNA agents, Δku cells are only marginally sensitive, if at all, when compared with wt cells, but $\Delta ku \Delta recA$ cells are more sensitive to DNA damage than $\Delta recA$ cells (Mascarenhas *et al.*, 2006; Cardenas *et al.*, 2009). In stationary-phase cells or in germinating spores, however, where there is only one intact chromosome template, $\Delta recA$ cells become moderately sensitive to DSBs, and the double $\Delta ku \Delta recA$ or $\Delta ligD \Delta recA$ mutants are significantly more sensitive than $\Delta recA$ cells (Weller *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Moeller *et al.*, 2007, 2008). It is likely that under certain circumstances, NHEJ may serve as a backup system for DSB repair in exponentially growing cells (Mascarenhas *et al.*, 2005; Cardenas *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011). It is believed that in the absence of basal end processing by the DNA recognition complex (RecN in concert with PNPase, the product of the *pnpA* gene) and before long-range end-processing, blunted or nearly blunted DNA ends accumulate and two-ended DSB repair occurs via NHEJ. This is consistent with the observation that in *B. subtilis*, $\Delta pnpA$ is epistatic with $\Delta recN$ and Δku , which by themselves are nonepistatic (Cardenas *et al.*, 2009). However, in *Mycobacterium* Ku protein protects DSBs from resection by the AdnAB helicases–nucleases complex (Sinha *et al.*, 2009). Similarly, Ku70–Ku80 protects DNA ends from resection by Exo1 in eukaryotes (Tomita *et al.*, 2003; Wasko *et al.*, 2009), suggesting that the Ku protein might delay end resection by one of the end-processing avenues.

NHEJ repairs DSBs by short processing of the ends, followed by ligation, without any major diffusion of DNA ends, because both ends are available in the neighborhood. To perform these reactions, the eukaryotic NHEJ machinery relies on many proteins, including structural stabilization factors, as well as DNA degradation, polymerization and ligation functions, whereas the bacterial NHEJ system relies only on a small number of proteins (reviewed by Daley *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 2007; Shuman & Glickman, 2007; Weiner *et al.*, 2009, Table 3; Lieber, 2010). Nevertheless, all NHEJ reactions require a core machinery that is composed of three discrete sets of functions: in bacteria, the DSB recognition homodimeric protein Ku, which binds and bridges DNA ends, recruits the DNA ligase, LigD and DNA end cleaning proteins to DNA ends (Weller *et al.*, 2002, Fig. 2b). In *B. subtilis*, there is a set of proteins with potential activity in basal end processing (e.g. SbcCD, SbcEF, PNPase, DNAP X), but their role in NHEJ remains to be documented (Mascarenhas *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; Baños *et al.*, 2008; Cardenas *et al.*, 2009; Ayora *et al.*, 2011, Table 3). LigD is a multidomain enzyme consisting of a C-terminal ATP-dependent ligase domain fused to an upstream polymerase

Table 3. Proteins involved in NHEJ in various systems

Activity	<i>B. subtilis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>H. sapiens</i>
End processing	RecN/PNPase SbcCD, SbcEF –	RecN/PNPase?	MRN – Artemis-DNA- PK _{cs}
End binding	Ku	Ku	KU70-KU80
kinase/ phosphatase	LigD?	LigD	PNK and others
Terminal processing	PcrA/RecQ?/RecS?	UvrD1	WRN, BLM BRCA1
DNA ligase	–	–	LIGIV/XRCC4
DNA polymerase	LigD	LigD	DNAP μ and DNAP λ
5' flap endonuclease	DNAP X?	?	FEN1

module (Akey *et al.*, 2006; Brissett *et al.*, 2007). It was proposed that after basal end processing, Ku, in the absence of RecN, binds to the DNA ends and LigD seals them (Weller *et al.*, 2002; Mascarenhas *et al.*, 2006; Shuman & Glickman, 2007; Baños *et al.*, 2008; Cardenas *et al.*, 2009). Indeed, ablation of PNPase, RecN, SbcC and UvrD1, together with Ku, sensitizes *Bacillus* and *Mycobacterium* cells to IR (Mascarenhas *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; Cardenas *et al.*, 2009). Whether RecQ, RecS or PcrA/UvrD DNA helicases play a specific role in NHEJ remains to be demonstrated. Because many bacteria are capable of conducting NHEJ, although this quality is not present in other closely related bacteria, it is likely that NHEJ acquisition or maintenance is a stress-driven process that cannot be inferred by phylogeny (see Weiner *et al.*, 2009).

In the absence of a homologous donor and after RecBCD-dependent end processing, two-ended DSBs can also be joined upon exposure of short stretches of homology or microhomology, at least in *E. coli* and *Mycobacteria* (Chayot *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011). This single-strand annealing (SSA) avenue, which resembles eukaryotic SSA (Ivanov *et al.*, 1996; Mortensen *et al.*, 1996), was detected upon inactivation of RecA and Ku in *Mycobacteria* (Gupta *et al.*, 2011). The proteins that may catalyze strand annealing, flap removal, gap filling and end ligation in bacteria remain to be characterized.

DNA end-processing and end recruitment promote DSB repair by HR

If the DNA replication fork encounters a nick in one of the DNA strands, this interruption is converted to a one-ended DSB with a variable region of unreplicated 3'-tailed duplex DNA if the nick is in the lagging strand or to a blunt or nearly blunted end if the nick is in the leading strand. On the other hand, chemical or physical damage can generate two-ended DSBs. In both cases, the DNA ends are resected in a

5' → 3' manner to yield a recombinogenic 3'-tailed DNA that is bound by the recombinase (RecA or Rad51), aided by mediator factors, to form a nucleoprotein filament, hence committing to DSB repair by HR rather than by NHEJ (Table 2). In all living organisms, end resection is characteristically a two-step process: in the first step, basal resection generates the substrate for long-range processing, while the second step involves processive resection by redundant pathways consisting of nucleases, DNA helicases and associated proteins (Michel *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007a, Fig. 4, Gravel *et al.*, 2008; Mimitou & Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008). In bacteria, processive end resection is achieved by either variations or combinations of two otherwise alternative avenues, by either one of them, as a *solo* orchestrated avenue, or by a *pseudo-solo* pathway, when a main solo avenue is impaired and a secondary avenue has to be activated. Some bacteria can also use, under certain conditions, an end resection avenue hijacked from lysogenic viruses. For example, the SKIN prophage, which lysogenizes *B. subtilis* 168 cells, encodes an end-processing exonuclease (RecE), an SSA protein (RecT) and an HJ resolvase (RusA) (Ayora *et al.*, 2011). In other cases, these sets of functions are provided by different cryptic prophages, as *E. coli* K12 lysogenized by Rac (RecE/SbcA, RecT) and DLP12 (RusA) defective phages (Clark & Sandler, 1994; Sharples, 2001). These functions alone, or in concert with other cell factors, help cells to cope with DSBs via the SbcA pathway (Clark & Sandler, 1994; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 2007c). This DSB repair avenue (see Table 1), which proceeds by a RecA-independent recombination, is necessary for viral recombination-dependent DNA replication (Ayora *et al.*, 2011), and will not be discussed.

Two alternative avenues

In bacteria other than those of the *Gammaproteobacteria* class, which usually lack the SbcB/ExoI function, the activation of the RecFOR avenue might not be required. In these bacteria, DNA end resection involves two alternative avenues or variations of one of them, with bacteria of the *Firmicutes* phyla the prototype. They consist of a complex of helicase–exonucleases (one helicase, two nucleases) as the AddAB enzyme, present also in bacteria of the *Alpha*- and *Betaproteobacteria* classes or an ssDNA exonuclease (RecJ) that works in concert with a DNA helicase [of the RecQ-like (RecQ, RecS) or the UvrD-like (RecD2, PcrA) family] and with the SsbA protein that stimulates the helicase and exonuclease activities. Similarly, eukaryotic single-strand binding protein, RPA, plays an active role during end processing (Nimonkar *et al.*, 2011).

In *B. subtilis*, genetic studies revealed that the *addAB* and Δ *recJ* double mutant strain has a synergistic effect, with survival after DNA damage being reduced to the levels seen

in $\Delta recA$ cells (Sanchez *et al.*, 2006). Here, basal end processing may be carried out by the poorly characterized PNPase enzyme, because this bacterium lacks the majority of all the 3' \rightarrow 5' specific ssDNA exonucleases described for *E. coli* (e.g. ExoI/SbcB, ExoIX, ExoX, ExoXI and perhaps ExoVII) (Cardenas *et al.*, 2009). These results suggest that in *B. subtilis*, there are two major parallel end-processing avenues, the AddAB- and the RecJ-dependent, which contribute equally to accumulate 3'-tailed duplex DNA (Ayora *et al.*, 2011). The AddAB enzyme consists of one N-terminal UvrD-like motor (AddA), which translocates DNA with a 3' \rightarrow 5' polarity, and two distinct C-terminal nucleases. A second inactive helicase motor is present in the AddB subunit (Yeeles & Dillingham, 2010). Long-range end processing performed by the AddAB avenue is similar to the activity of other nuclease-helicase complexes of the AddAB family (namely RecBCD_{Eco} or AdnAB_{Mtu}), although the implication of AddAB in the recruitment of RecA onto naked ssDNA, as it has been reported in the *E. coli* case, remains to be documented (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles *et al.*, 2009; Unciuleac & Shuman, 2010; Ayora *et al.*, 2011).

A RecQ-like DNA helicase (RecQ or RecS) in concert with RecJ, unwinds duplex DNA with blunt or 3'-overhangs, degrades the 5'-terminated strand and protects the ssDNA ends, resulting in a 3'-ssDNA overhang that is bound by SsbA that further stimulates the helicase and exonuclease activities (Sanchez *et al.*, 2006; Handa *et al.*, 2009). Although both avenues are operatively and functionally active, *Firmicutes* might have other end-processing avenues. There are some proteins (e.g. RecD2 and PcrA/UvrD DNA helicases) whose roles in end processing have not been addressed in *B. subtilis*.

Pseudo-solo orchestrated avenue

This avenue, which was initially described in *E. coli* (of the *Gammaproteobacteria* class), is the best-characterized end resection avenue. As in all cases, end resection occurs in two steps: a basal resection by a single-strand specific exonuclease and the second step, consisting of a long-resection performed by the highly processive helicases-nuclease RecBCD_{Eco} complex (Amundsen & Smith, 2003; Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Niu *et al.*, 2009, Fig. 2, Yeeles & Dillingham, 2010). Basal resection is needed in order to blunt the ends before RecBCD-mediated end processing, because 5' or 3' overhangs on duplex DNAs of ~25 nt or longer strongly impede the action of RecBCD_{Eco} (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles & Dillingham, 2010, and references therein). It has been proposed that a 3' \rightarrow 5' ssDNA exonuclease (e.g. SbcB/ExoI_{Eco}) and/or an enzyme with more complex activities (e.g. SbcCD_{Eco}) play a role in DNA end blunting (basal end-processing) (Connelly &

Leach, 2002; Thoms *et al.*, 2008). RecBCD_{Eco}, which is a heterotrimer complex composed of two helicase subunits (RecB and RecD) that translocate in parallel and with opposite polarities, and one nuclease module (located at the C-terminus of RecB), which excises the single strands displaced by the helicases, is the only contributor to processive end resection of one- or two-ended DSBs in an otherwise wt strain (Dillingham & Kowalczykowski, 2008). The RecBCD_{Eco} complex resects both DNA ends, which are differently degraded during translocation, until a *chi* sequence is encountered. Then, the RecBCD_{Eco} 3' \rightarrow 5' exonuclease activity is attenuated, while the enzyme continues to unwind the DNA duplex and degrades the 5' \rightarrow 3' strand (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles & Dillingham, 2010, Fig. 2). The net result is a duplex molecule with a 3'-ssDNA tail starting at the *chi* sequence (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Niu *et al.*, 2009; Yeeles & Dillingham, 2010). That in *E. coli*, the RecBCD pathway is the unique actor in DSB repair is consistent with the observation that the DSBs generated by the SbcCD_{Eco} hairpin DNA-cleaving nuclease are dependent on DNA replication, and require RecBCD_{Eco}, RecA_{Eco}, RuvABC_{Eco}, RecG_{Eco} and PriA_{Eco} but not RecFOR_{Eco} (Eykelboom *et al.*, 2008). The RecBCD_{Eco} complex actively loads RecA_{Eco} onto naked ssDNA (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles & Dillingham, 2010).

Escherichia coli cells, in the *recB*, *recC*, *sbcB/exoI* and *sbcC* background, activate an alternative avenue: the RecFOR pathway. This suggests that 3' ssDNA can be produced in the absence of RecBCD_{Eco}, but it is unstable and subsequently resected by the SbcB/ExoI_{Eco} or SbcCD_{Eco} nucleases (Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999; Cox *et al.*, 2000; Cromie & Leach, 2000; McGlynn & Lloyd, 2002b; Courcelle & Hana-walt, 2003; Mariani, 2004; Michel *et al.*, 2004; Kreuzer, 2005; Persky & Lovett, 2008). In the RecFOR pathway, RecJ, in concert with RecQ, degrades the 5' ssDNA end, producing 3'-ssDNA tails with the help of SSB (SsbA) that stimulates the helicase and exonuclease activities and protects the ssDNA ends (Clark & Sandler, 1994; Amundsen & Smith, 2003; Michel *et al.*, 2004; Handa *et al.*, 2009; Yeeles & Dillingham, 2010). In a reconstituted *in vitro* assay, RecJ_{Eco} can degrade one strand of duplex DNA, in the absence of RecQ_{Eco} (Handa *et al.*, 2009).

Not all bacteria of the *Gammaproteobacteria* class follow this pseudo-solo orchestrated end processing. For example *Acinetobacter baylyi*, which lacks *recQ* and *hld* genes, is nonviable for a null *recJ* mutation when additional mutation(s) in *recBCD* or *recD* are introduced (Kickstein *et al.*, 2007). It is likely that in this bacterium, RecBCD_{Aba} and RecJ_{Aba} represent separate active end-processing pathways, and that RecJ_{Aba}, in concert with an UvrD-like helicase (Rep_{Aba}, PcrA_{Aba}) or any other DNA helicase, catalyzes end resection even in the presence of RecBCD_{Aba} (Kickstein *et al.*, 2007).

A solo orchestrated avenue

Bacteria of the *Epsilonproteobacteria* class (e.g. *H. pylori*), which might be devoid of the RecQ function (Rocha *et al.*, 2005), encode a helicase–nucleases complex (AddAB) (Cromie, 2009). Here, the inactivation of RecO_{Hpy} makes cells moderately sensitive to IR-induced DSBs, but the absence of the AddAB_{Hpy} complex makes cells as sensitive as a *recA*_{Hpy} mutant. The *recO*_{Hpy} or *recR*_{Hpy} mutation does not increase the sensitivity does of *addAB*_{Hpy} cells (Marsin *et al.*, 2010), suggesting that the RecFOR_{Hpy} pathway cannot act as a backup system of AddAB_{Hpy} long-range end processing, and that in this bacterium, only one avenue (AddAB_{Hpy}) is active (Marsin *et al.*, 2010).

Bacteria of the *Actinobacteria* phylum are devoid of the RecJ function and possess a helicase–nuclease complex, AdnAB, of the AddAB family. Some species of the phylum also encode for a RecBCD complex (Cromie, 2009), but they are a nonfunctionally redundant helicases–nuclease(s) complex, because AdnAB is involved in HR and the RecBCD complex required for SSA (Gupta *et al.*, 2011). In *Mycobacteria*, basal end processing is carried out by poorly characterized enzymes, whereas long-range processing is catalyzed by the AdnAB complex (Unciuleac & Shuman, 2010). The resection process consists of two N-terminal UvrD-like motors that translocate in tandem with a 3' → 5' polarity and two C-terminal nucleases that form the heterodimeric AdnAB_{Mtu} complex (Unciuleac & Shuman, 2010). AdnAB_{Mtu} resects both DNA ends, which are differentially degraded by the two exonuclease subunits, until a *chi* sequence is encountered (Niu *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2009; Unciuleac & Shuman, 2010). Upon *chi* cleavage, the 3' → 5' exonuclease activity is blocked in AdnAB_{Msm}, while the complex continues to unwind the DNA duplex and degrades the 5' → 3' strand (Chedin *et al.*, 2006; Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles *et al.*, 2009; Unciuleac & Shuman, 2010, Fig. 2). The net result is a duplex molecule with a 3'-ssDNA tail starting at the *chi* sequence and coated by SSB/SsbA (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Niu *et al.*, 2009; Yeeles *et al.*, 2009; Unciuleac & Shuman, 2010). The implication of AdnAB_{Mtu} which is required for RecA-dependent HR, in RecA_{Mtu} loading onto naked ssDNA by a direct protein–protein interaction remains to be documented (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles *et al.*, 2009; Unciuleac & Shuman, 2010). Mycobacterial RecBCD is not involved in HR, rather in RecA-independent SSA (Gupta *et al.*, 2011).

A solo orchestrated avenue and its variations

In Bacteria of the *Deinococcus-Thermus* phylum, devoid of helicase(s)–exonuclease(s) complexes of the AddAB/RecBCD/AdnAB family (Rocha *et al.*, 2005; Han *et al.*,

2006), the resection process involves an ssDNA exonuclease and a DNA helicase of either the RecQ-like or the UvrD-like family. In these bacteria, poorly characterized enzymes carry out basal end processing. RecJ ssDNA exonuclease, in concert with a RecQ- or a UvrD-like (RecD2, PcrA/UvrD) helicase, degrades the 5'-terminated ssDNA strand, thereby producing 3'-ssDNA tails (Fig. 2). This is consistent with the observation that: (1) RecJ is an essential protein in *D. radiodurans* (Bentchikou *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2010), (2) *Thermus thermophilus* is naturally devoid of the RecQ and RecD2 helicases (Rocha *et al.*, 2005) and (3) *D. radiodurans* cells lacking either *recQ* or *recD2* have a wt DNA repair capacity, whereas *uvrD* cells show a markedly decreased radioresistance, strongly suggesting the active role of UvrD_{Dra} in recombinational DNA repair (Bentchikou *et al.*, 2010). UvrD_{Dra}, RecQ_{Dra} or another uncharacterized DNA helicase unwinds DNA with a 3' → 5' polarity and uses both blunt-ended and 3'-tailed dsDNAs as substrates, whereas RecD2_{Dra} unwinds DNA with a 5' → 3' polarity and uses both blunt-ended and 5'-tailed dsDNAs (Umezū & Nakayama, 1993; Wang & Julin, 2004; Singleton *et al.*, 2007; Shereda *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2008). It is therefore appealing to think that the *in vivo* DNA helicase 'chosen' is dictated by the nature of the DNA substrate, although the presence of a specific DNA structure or a binding partner could also play a role in the election of the helicase.

End resection in eukaryotes is also a two-step process: the MRN/X complex (constituted by Mre11, Rad50 and Nbs1 in mammals or Xrs2 in budding yeast MRN/X) in concert with CtIP (in mammals) or Sae2 (in budding yeast) catalyzes basal resection (Table 2) (reviewed by Mimitou & Symington, 2009a, b; Niu *et al.*, 2009). This initial resection is followed by redundant pathways consisting of nucleases, helicases and associated proteins that perform processive resection by the Dna2 helicase–exonuclease with 5' → 3' polarity as part of the BLM/Sgs1-TopoIIIa/Top3-RMI1/Rmi1-DNA2/Dna2 complex (Cejka *et al.*, 2010a; Niu *et al.*, 2010) or by the BLM-Exo1, in concert with MRN and RPA, to form a long 3' ssDNA tail (long-range end processing) (Table 2) (Mimitou & Symington, 2009a; Niu *et al.*, 2009; Nimmonkar *et al.*, 2011).

End recruitment

Cytological studies have revealed that long-range end resection is necessary for end-tethering or redistribution from two or more *B. subtilis* RecN foci into a discrete RC per nucleoid within the first 30 min after DSB induction, because in the absence of AddAB and RecJ, RecN-mediated end diffusion (a discrete RecN focus/nucleoid) and RecA-mediated homology search (RecA threads) are not seen (Sanchez *et al.*, 2006). Concomitant with end-processing of the 5' end, RecN binds to the ssDNA tail of the duplex

molecule at the DSB, protecting the 3'-OH end and facilitating the tethering of these DNA ends (Kidane *et al.*, 2004; Kidane & Graumann, 2005a; Sanchez & Alonso, 2005; Sanchez *et al.*, 2006). We thus hypothesize that: (1) end-processing takes place after damage recognition by RecN and before RecN-mediated concentration of DNA ends towards a unique focus per nucleoid (end recruitment), and RecA colocalization with RecN-induced RC and (2) basal resection and/or long-range end-processing commit to repair the DSBs by HR rather than by NHEJ.

End-tethering by the RecN ATPase could also restrict chromosome diffusion by keeping several DNA ends in close proximity so that the slow long-range motion of topological domains, including the intact target template DNA, is spatially confined to facilitate genome-wide homology search of multiple DNA ends by the RecA nucleofilament (Postow *et al.*, 2004; Barzel & Kupiec, 2008; Weiner *et al.*, 2009). This is consistent with the observation that: (1) *B. subtilis* *recN* and *ku* mutations are nonepistatic, (2) the absence of cohesion (Δsmc cells) renders cells very sensitive to DSB-producing DNA damaging agents and (3) DNA partners of one-ended DSB repair are confined into spatial proximity, while such close proximity is not obvious during two-ended DSB repair (Dervyn *et al.*, 2004; Mascarenhas *et al.*, 2006; Cardenas *et al.*, 2009). In eukaryotic cells, end tethering and DSB coordination are catalyzed by Rad50, as part of the MRN/X-CtIP/Sae2 complex (Hopfner & Tainer, 2003; Mimitou & Symington, 2009b; Niu *et al.*, 2009).

Recombinase loading

In *Firmicutes*, RecA hydrolyzes dATP preferentially over rATP, and supports more efficiently the DNA strand exchange reaction in the presence of dATP (Lovett & Roberts, 1985; Steffen & Bryant, 1999; Carrasco *et al.*, 2008). RecA_{Eco}, under identical experimental conditions, shows a preference for rATP (Lovett & Roberts, 1985; Steffen & Bryant, 1999). Saturating amounts of SsbA/SSB, independent of the order of addition, reduce the ssDNA-dependent dATPase activity and block the ATPase activity of RecA (Lusetti & Cox, 2002). Hence, SsbA/SSB must be displaced from the ssDNA to assemble the RecA presynaptic filament. Alternatively, SsbA/SSB recruits RecA mediators [RecO (RecOR_{Eco}) or RecOR (RecFOR_{Eco})] onto ssDNA, and the mediators facilitate RecA loading (Lohman & Ferrari, 1994; Shereda *et al.*, 2008). Genetic studies have demonstrated that a *recF*, *recO* or *recR* defect is partially overcome by common suppressors in both *B. subtilis* and *E. coli*, (e.g. a *recA* mutant allele, etc.), suggesting that RecA recruitment and/or RecA filament modulation by RecF, RecO and RecR might occur in a concerted manner (single step) (Alonso & Luder, 1991; Wang *et al.*, 1993; Carrasco *et al.*, 2001). Cytological studies in *B. subtilis* cells support a stepwise assembly, with RecO

and RecR colocalizing with damage-induced RecN foci, just before or together with RecA, within the first 30–45 min after MMC addition (see Fig. 4). In exponentially growing cells, RecA localizes throughout the nucleoids, whereas this pattern of localization changes dramatically upon induction of DSBs. RecA forms discrete foci that colocalize with damage-induced RecN foci, 30–45 min after MMC addition. Then, damage-induced RecA foci form threads that emanate from RecN-RecOR-RecA foci (Kidane & Graumann, 2005a). RecF foci formation, which is strictly dependent on the presence of RecO, colocalizes with RecN later, concomitant with RecA threads formation (Kidane *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2006, Fig. 4). *In vitro* studies have been carried out to understand how RecFOR works. They reveal that both *B. subtilis* and *E. coli* RecO, which interacts with SsbA/SSB, alone or in concert with RecN-RecR, load RecA onto SsbA/SSB-coated 3'-ssDNA tails (Umezumi *et al.*, 1993; Umezumi & Kolodner, 1994; Manfredi *et al.*, 2008, 2010). Recently, it has been shown that RecF_{Eco} plays an accessory role in loading RecA_{Eco} · ATP · Mg²⁺ onto linear ssDNA (Handa *et al.*, 2009). Once the RecA nucleofilament has been formed, it catalyzes a search for homology by random and transient interactions, followed by strand invasion and synapsis, resulting in the generation of extensive heteroduplex regions, where strand transfer by branch migration occurs (Cox, 2007a,b; Galletto & Kowalczykowski, 2007; Ayora *et al.*, 2011).

Biochemical data show that the RecBCD_{Eco} complex, upon interaction with the *chi* site, activates RecB_{Eco} to facilitate the loading of RecA_{Eco} onto the exposed naked ssDNA (Anderson *et al.*, 1999; Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Yeeles & Dillingham, 2010). The activated RecB_{Eco} domain also interacts with the RecA_{Eco} nucleoprotein filament (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Lucarelli *et al.*, 2009; Yeeles & Dillingham, 2010). It is unknown whether the RecBCD_{Eco} paradigm for RecA_{Eco} loading onto naked ssDNA, upon DSB and concomitant end-resection, can be extended to other members of the family (AddAB or AdnAB).

Assembly and disassembly of the RecA filament is in turn regulated not only by dATP and ATP (Lovett & Roberts, 1985; Steffen & Bryant, 1999; Carrasco *et al.*, 2008) but also by the interaction with many proteins (review by Cox, 2007a,b). There are a number of RecA nucleofilament modulators such as DinI, RdcC or RecU restricted to certain bacterial classes (Cox, 2007b; Cañas *et al.*, 2008). The RecX_{Eco} or RecX_{Ngo} protein inhibits RecA_{Eco}/RecA_{Ngo} filament extension, leading to net filament disassembly (Stohl *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2004; Gruenig *et al.*, 2010). RecF_{Eco} antagonizes RecX_{Eco} function and stimulates RecA_{Eco}-mediated joint molecule formation in a reconstituted early step of DSB repair (Lusetti *et al.*, 2006; Handa *et al.*, 2009; Gruenig *et al.*, 2010). The RecU HJ resolvase modulates RecA activities by enhancing RecA-promoted D-loop formation and inhibiting DNA strand exchange (Ayora *et al.*, 2004;

Carrasco *et al.*, 2005, Fig. 3, McGregor *et al.*, 2005; Cañas *et al.*, 2008). The isolation of the separation of function mutants, i.e. proficient in HJ cleavage, but deficient in RecA modulation, has been reported (Cañas *et al.*, 2008). Whether other HJ resolvases modulate RecA functions remains to be determined. In eukaryotes and archaea, the Rad54 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange by directly interacting with the Rad51 nucleoprotein filament and remodelling the topology of duplex DNA (reviewed by San Filippo *et al.*, 2008). The widely conserved HepA1 and HepA2 proteins, which belong to the Swi2/Snf2 family of helicases, as Rad54, might play such a role in HR (Haseltine & Kowalczykowski, 2009; Ayora *et al.*, 2011, Table 2). A number of proteins have been identified that exert an antirecombinase activity, as the PcrA/UvrD DNA helicase that promotes RecA/RecA_{Eco} nucleoprotein filament dissociation (Veaute *et al.*, 2005; Anand *et al.*, 2007). Finally, proteins of the MutSII subfamily (bacterial MutS2 and eukaryotic MSH4 and MSH5) are involved in HR, probably acting as modulators. The MutS2_{Hpy} protein inhibits RecA-mediated DNA strand exchange, whereas MutS2_{Thh}, which binds and processes branched structures (D-loop, nicked HJ), may suppress HR through the resolution of early recombination intermediates (Pinto *et al.*, 2005; Fukui *et al.*, 2008).

Strand exchange, replication fork restart, branch migration and HJ processing

One-ended DSB repair, stable DNA replication and eukaryotic break-induced replication resemble recombination-dependent replication used by bacteriophages to generate concatemeric DNA substrates (Viret *et al.*, 1991; Kogoma, 1997; Ayora *et al.*, 2002; Krogh & Symington, 2004; Martinez-Jimenez *et al.*, 2005; McEachern & Haber, 2006). RecA bound to the 3'-tailed end promotes invasion of the homologous duplex, causing the displacement of one of the two DNA strands and the formation of a D-loop intermediate (Fig. 2a). The 3' end from the broken chromosome is used to prime leading strand DNA synthesis with the donor duplex as a template, followed either by D-loop disruption or HJ resolution (Fig. 3a). In the former case, the disruption of a D-loop or a nicked HJ displaces the invaded strand to reconstitute a replication fork (Fig. 3a, steps i–iii), whereas in the latter case, upon branch migration, the other end of the break interacts with the displaced strand to form a HJ (Fig. 3a, steps iv–vi). RuvAB loads the RecU/RuvC resolvase and the resolution of the HJ allows the displacement of the invading strand. A processive replication fork is established and DNA synthesis proceeds to the end of the chromosome. In two-ended DSB repair, the second 3'-tailed end is captured by a RecA-independent event, leading to a double HJ (Fig. 3b). The processing of the two possible recombination intermediates will be discussed in the next section.

In *D. radiodurans*, the multi-ends are repaired by a RecA-dependent mechanism, using overlapping homologies, to form a full genome by extended SDSA (ESDSA), followed by cross-over (Zahradka *et al.*, 2006). In ESDSA, the chromosomal fragments of the multigenome copies are used both as primers and as templates for the massive synthesis of complementary single strands, as occurs in a single round of a multiplex PCR (Zahradka *et al.*, 2006).

Replication restart

Some features of the initiation of DNA replication in *E. coli* are conserved throughout Bacteria. In *E. coli* cells, the replication apparatus (replisome) is loaded onto the ssDNA region formed by DnaA · ATP-mediated helix opening at the replication origin (*oriC*) by a direct interaction of the replisome organizer, DnaA · ATP, with the replicative hexameric helicase, complexed with its helicase loader, DnaB · ATP · DnaC (Baker & Bell, 1998). In a second step, DnaB · ATP bound to ssDNA loads the primase, DnaG, and by interaction with the τ (DnaX) subunit of DNAP III loads the DNAP III holoenzyme (Baker & Bell, 1998; O'Donnell, 2006). In a third step, DnaG provides the 3'-OH end to be elongated by DNA synthesis. After the initiation reaction, DnaA and *oriC* are inactivated by different mechanisms in different bacteria, to prevent reinitiation in the same round of the cell cycle (Katayama *et al.*, 2010). Hence, replication fork reactivation requires *oriC*-independent reloading of the replicative hexameric helicase (in a D-loop intermediate). In *E. coli*, this process can follow three different avenues, PriA-PriB-DnaT, PriC-PriA or PriC-Rep, depending whether the template for the recombination intermediate is in the leading or the lagging strand (Sandler, 2000; Heller & Marians, 2005; Gabbai & Marians, 2010). At a D-loop, DnaG and the replicase (DNAP III) are recruited via interactions with DnaB. DnaG, upon interaction with the DnaB helicase, initiates RNA synthesis on the lagging strand, and under certain circumstances, forms new primers also on the leading strand by binding the DnaB helicase on the lagging strand (Gabbai & Marians, 2010). This allows the replication fork to continue passing damaged sites in the leading and lagging strand template, leaving the lesion behind in the form of an ssDNA gap.

In *B. subtilis* cells, three replication proteins, DnaD, DnaB and DnaI, load the replicative hexameric helicase DnaC (different from the DnaC_{Eco} helicase loader) at the *oriC* region during replication initiation and at stalled replication forks during replication restart (Bruand *et al.*, 2001, 2005; Marsin *et al.*, 2001; Velten *et al.*, 2003; Rokop *et al.*, 2004; Ioannou *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2010). Indeed, there are two loading systems for the hexameric replicative helicase at the *oriC* region: the DnaDB- and DnaI-dependent mechanisms (Velten *et al.*, 2003; Ioannou *et al.*, 2006; Nuñez-

Ramirez *et al.*, 2007; Smits *et al.*, 2010). DnaC bound to ssDNA loads DnaG and by interacting with the stated τ (DnaX) subunit the replicases DNAP C and DNAP E are loaded (Bruck & O'Donnell, 2000; Dervyn *et al.*, 2001; Noirot *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2010). Finally, DnaG provides 3'-OH end for the leading strand synthesis, while DnaG and DnaE provide the 3'-OH end to be elongated in lagging strand DNA synthesis (Sanders *et al.*, 2010). The loading of the helicase via two stable intermediates and the use of two DNA polymerases, DNAP C (Pol ϵ -like) and DNAP E (Pol α -like), resemble the replication apparatus of eukaryotes (Velten *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2010). Replication fork restart in *B. subtilis* shares some features with the *E. coli* system, although the presence of the PriB, PriC and DnaT assembly factors is not obvious (Noirot *et al.*, 2007). Here, PriA, in concert with DnaB, DnaD and SsbA, load the replication apparatus at the recombination intermediate (Bruand *et al.*, 2001, 2005; Polard *et al.*, 2002; Noirot *et al.*, 2007; Smits *et al.*, 2010, Fig. 4). From the primosome components, only PriA is ubiquitous among free-living bacteria. The restart components of the PriA, DnaD and DnaB type or of the PriA-PriB-DnaT, PriC-PriA or PriC-Rep type are not observed in many bacterial endosymbionts (Sharples, 2009). For example in species classified in the *Mollicutes* class PriA, DnaD and DnaB are not observed, and the DnaB protein is not observed in species classified within the *Clostridia* class (Petit, 2005; Sanchez *et al.*, 2007c). The role of a hypothetical PcrA pathway in replication fork restart has not been addressed experimentally. Additionally, DNAP I and/or YpcP (a DNA-Pol I paralogue), type II DNA topoisomerases and a DNA ligase are needed to facilitate the closing of the DNA ends (reviewed by Kuzminov, 1999). Then, branch migration and resolution proteins resolve the recombination intermediates, once the complete replisome has been loaded, in order to fully reconstitute the active replication fork (see Fig. 3a).

Cytological studies have shown that SbcC foci colocalize with DnaX, which is a bona fide replicase marker, 120 min in ~40% of the cells upon addition of MMC, whereas RecN and SbcE foci, on the other hand, colocalize with DnaX in less than 15% or 20% of cases, respectively (Mascarenhas *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2010, Fig. 4). This is consistent with the observation that SbcC and SbcE interact with the DnaG primase, and SbcC_{Eco} interacts with the replicase (Noirot & Noirot-Gros, 2004; Darmon *et al.*, 2007). However, whether SbcC acts in any replication-restart pathway remains unknown.

Branch migration and HJ processing

The RecG and RuvAB families of branch migration translocases are ubiquitous in free-living bacteria (McGlynn & Lloyd, 2002a; Wen *et al.*, 2005). The RecU/RuvC HJ resol-

vase (Table 2) forms a single, discrete focus on the nucleoid 90–120 min after the induction of DSBs, in a RuvAB-dependent manner, and it colocalizes with RecN at the RC, which confirms that the repair of DSBs is a sequential process (Sanchez & Alonso, 2005, Fig. 4; Sanchez *et al.*, 2005, 2006).

There are at least two possible avenues to process the one-ended recombination intermediates: in one of them, branch migration translocases such as RecG or RuvAB catalyze the regression of the extended heteroduplex so that the D-loop becomes now a HJ intermediate (Fig. 3a, step v). Then, strand cleavage of the single HJ by RuvAB and RecU, in *Firmicutes*, or RuvABC in other bacteria, and concomitant strand ligation generate the substrate that leads to replication fork reactivation. Depending on the orientation of the cleavage, cross-over (CO) products, where strands are exchanged relative to the initial chromosome organization (dimeric chromosomes), or non-crossover (NCO) products (monomeric chromosomes), where no strand exchange occurs, can be generated (West, 2003, Fig. 3a, Sanchez *et al.*, 2007c; Ayora *et al.*, 2011). Δ recU cells display defective resolution of HJs and when SMC is present in limiting amounts, 25% of the cells are anucleated. In the absence of SMC, however, the removal of RecU is synthetically lethal (Pedersen & Setlow, 2000), suggesting that additional functions act in parallel to RecU/RuvC_{Eco}. In the second model, RecG branch-migrates the D-loop to allow heteroduplex extension (Fig. 3a, step iii). Then, the D-loop or the nicked HJ is resolved by the action of the MutS2 disruptase (Fukui *et al.*, 2008), and concomitant strand ligation generates the substrate that leads to replication fork reactivation (Fig. 3a, step iii). This HJ-independent one-ended DSB repair resembles break-induced replication (Kogoma, 1997; Pâques & Haber, 1999; Krogh & Symington, 2004; Mariani, 2004).

The two-ended DSB repair model (Szostak *et al.*, 1983) differs from the one-ended DSB models in that the D-loop intermediate can be processed by three different mechanisms and that there are two HJs rather than one (Fig. 3b). In two of these mechanisms, extension of the strand exchange reaction after a second-end capture leads to the formation of a double HJ (Fig. 3b, steps iii–vii), in which none (dissolution) or two of the four DNA strands (resolution) are cleaved (Holliday, 1967; Szostak *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2005; Bachrati & Hickson, 2008; Klein & Symington, 2009; Bzymek *et al.*, 2010; Cejka *et al.*, 2010b). In the third mechanism, the presence of a double HJ is not obvious (Fig. 3b, steps viii–ix). The three mechanisms will be briefly described:

HJ resolution

Once the genetic information lost at the break is restored, by copying the homologous template, the RecU/RuvC_{Eco} HJ

resolvase, with the help of the RuvAB branch migration translocase, cleaves the recombination intermediate (Fig. 3b, step v). As predicted by the canonical DSB repair model, the orientation of resolution of the double HJ results in either monomeric, NCO, or dimeric, CO, chromosomes with a 1:1 ratio (Szostak *et al.*, 1983). However, molecular mechanisms that introduce a strong bias for the direction of HJ processing towards NCOs have been described both in *E. coli* and in *B. subtilis* cells (West, 1997; Carrasco *et al.*, 2004). The generated CO can then be resolved by the site-specific recombination machinery coupled to DNA translocation before cell division.

Recently, it has been proposed that pathological PriA-dependent replication in *E. coli* cells, rather than the accumulation of RecA-dependent recombination intermediates, is primarily responsible for the phenotype of *recG* cells (Rudolph *et al.*, 2010). Conversely, the absence of proteins involved in processing and resolving of HJ intermediates in *B. subtilis*, like RecG, RuvAB or RecU, leads to chromosomal segregation defects that are suppressed in the $\Delta recA$ background (Sanchez *et al.*, 2005, 2007b). It is likely that the accumulation of toxic intermediates, in the absence of RecG, and defective resolution of HJs, in the absence of RuvAB or RecU, impair the segregation of daughter chromosomes, and hence preventing recombination suppresses the segregation defect (Carrasco *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007b). In the absence of any externally added DNA damaging agent, the inactivation of RecG or RuvAB reduces the plating efficiency to ~20% of that of the parental strain, as it also channels recombination intermediates into the CO pathway, leading to the accumulation of toxic intermediates (Carrasco *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007b). A $\Delta recG$ mutation renders cells very sensitive to DNA damaging agents and it is synthetically lethal with a $\Delta recU$ mutation (Sanchez *et al.*, 2005, 2007b). Thus, it is possible that the segregation of newly replicated chromosomes involves redundant pathways.

HJ dissolution

In the absence of branch migration translocases (RuvAB or RecG) and/or the HJ resolvase (RecU/RuvC_{Eco}), the HJs can be dissolved by a poorly defined avenue. It was proposed that Topo III, in concert with a RecQ-like (RecQ or RecS) or a UvrD-like (RecD2, UvrD/PcrA) DNA helicase and SsbA/SSB, may dissolve double HJs (Wu *et al.*, 1999, Fig. 3b, step vi, Table 1, Lopez *et al.*, 2005), as shown for eukaryotic cells (Bachrati & Hickson, 2008; Bzymek *et al.*, 2010; Cejka *et al.*, 2010b). However, direct evidence for HJ dissolution in bacteria has not been reported.

Nonreciprocal transfer of DNA via SDSA

Because $\Delta recG \Delta recU$ and $\Delta recG \Delta recQ$ double mutants exhibit a synthetic growth defect (Sanchez *et al.*, 2007b) and

$\Delta recG \Delta ripX$ cells are severely impaired in chromosomal segregation, it is possible that *in vivo* HJs intermediates are mainly resolved or dissolved. However, two-ended DSB repair in the absence of double HJ formation cannot be ruled out (Fig. 3b, steps viii–ix). Here, RecG translocates the D-loop that migrates with the replicase so that the helicase activity is coupled to DNA synthesis (Pâques & Haber, 1999; Krogh & Symington, 2004; Meddows *et al.*, 2004, Fig. 3b, steps viii–ix). After 3'-extension of the invading DNA end, the joint molecule is disrupted by unwinding (via bacterial PcrA/UvrD, RecQ? or eukaryotic Srs2) of the D-loop intermediate. The invading and extended 3'-end anneals via eukaryotic Rad52 or bacterial RecO to a complementary sequence at the other side of the break, leading to NCO products (Pâques & Haber, 1999; Krogh & Symington, 2004; McEachern & Haber, 2006; Manfredi *et al.*, 2010). The formation of NCOs via SDSA in bacteria remains to be documented (see Petit & Ehrlich, 2002; Veaute *et al.*, 2005), but in $\Delta recG$ cells, defects in chromosomal segregation occur with a > 150-fold frequency (Carrasco *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2007b). The presence of an alternative mechanism for SDSA that includes the action of the MutS2 disruptase cannot be discarded (see Fukui *et al.*, 2008). MutS2 recognizes branched DNA structures, including HJ structures, and cleaves them *in vitro* (Fukui *et al.*, 2008), but evidence for HJ disruption *in vivo* is missing (Pinto *et al.*, 2005, Fig. 2b, step viii). Such an activity is also proposed in Fig. 3a (steps i–iii) to reconstitute the replication fork after one-ended DSBs. Furthermore, there is no evidence in bacteria, other than *E. coli*, that the asymmetrically extended D-loop intermediate or nicked HJ (Fig. 2b, step viii) is processed by a Mus81-Eme1/Mms4-like structure-specific endonuclease, as reported for eukaryotic cells and proposed for *E. coli* cells (Osman *et al.*, 2003; Hollingsworth & Brill, 2004; Meddows *et al.*, 2004). This is consistent with the observation that RuvC_{Eco} might cleave nicked HJs (Osman *et al.*, 2009).

Disassembly of the recombination apparatus and chromosomal segregation

Concomitant with the dissipation of the RecA threads (Kidane & Graumann, 2005a), the RecU foci are dismantled 120 min after DSBs induction (Sanchez *et al.*, 2005), and before resumption of growth, complete removal of entanglement between sister DNAs created in the process of DNA replication (i.e. decatenation) and resolution of CO products (chromosomal dimers in circular genomes, Fig. 3b) take place. The former step is accomplished by the concerted action of the SMC/MukB condensin in concert with the heterotetrameric Topo IV (Tadesse *et al.*, 2005; Hayama & Mariani, 2010; Li *et al.*, 2010), whereas the latter step is accomplished when the preassembled RipX-CodV/

XerCD_{Eco}/XerS_{Lla} site-specific tyrosine-recombinase interacts with the septum-located SpoIIIE/FtsK_{Eco} or SftA translocases (Sherratt, 2003; Le Bourgeois *et al.*, 2007; Ptacin *et al.*, 2008, Fig. 4; Kaimer *et al.*, 2009). The tyrosine recombinase, whose action is regulated and facilitated by the DNA translocases, acts at the *dif* recombination sites, which are located close to the terminus region that is segregated last, just before cell division, so that site-specific recombination takes place when chromosome dimers need to be resolved. The role of the SpoIIIE/FtsK_{Eco} and/or SftA translocase in the reaction is to place the two *dif* sites into close proximity (Le Bourgeois *et al.*, 2007; Ptacin *et al.*, 2008) and to activate site-specific recombinase to catalyze the dimer to monomer conversion. Upon resolution, the translocase(s) directionally translocate the chromosomes through the division septum. Growth resumption takes place ~180 min after damage induction (Kidane *et al.*, 2004, Fig. 4).

Conclusions and perspectives

DSBs are dangerous lesions that need to be efficiently repaired in order to prevent the accumulation of chromosomal aberrations. This effect is particularly magnified in cells that are deficient in DSB repair (Sanchez *et al.*, 2007a, c). Genetic, cytological and biochemical data allow us to propose that, in *B. subtilis*, RecN recognizes pre-existing ssDNA tails on duplex DNA to form an RC (Fig. 4). SsbA binds and coats the ssDNA concomitantly to RecN binding to the 3'-end. In this process, the Hbsu/HU, LrpC chromatin-associated proteins and the SMC–ScpA complex, in concert with Topo IV, contribute to the organization, condensation and disentangling of the nucleoid (Sanchez & Alonso, 2005; Tadesse *et al.*, 2005; López-Torrejón *et al.*, 2006; Shintomi & Hirano, 2007; Cardenas *et al.*, 2009; Hayama & Mariani, 2010; Li *et al.*, 2010). As with eukaryotic or archaeal cells, end processing can be divided into two distinct steps: first, a 3' → 5' ssDNA exonuclease (e.g. PNPase in concert with RecN or SbcB_{Eco} SbcCD_{Eco}) promotes the basal removal of *dirty* ends or blunting of the lagging strand tails (Michel *et al.*, 2007; Cardenas *et al.*, 2009; Mimitou & Symington, 2009b). Second, long-range resection process involves *solo* or redundant avenues consisting of nucleases and DNA helicases, as the nuclease(s)–helicase(s) AddAB/RecBCD/AdnAB complex and/or the nuclease RecJ in concert with a RecQ-like or UvrD-like helicase and SsbA/SSB, to resect the 5'-ends generating the 3'-tailed duplex substrate needed for RecA filamentation (Dillingham & Kowalczykowski, 2008; Hopkins & Paull, 2008; Huertas *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Montague *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2009, 2010, Fig. 2; Cejka *et al.*, 2010a; Ayora *et al.*, 2011). By a RecN·RecN interaction, different 3'-OH ends are tethered together to concentrate the DNA ends, forming

a rosette-like structure *in vitro* or a discrete focus per nucleoid or RC *in vivo* (Kidane *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2008, Fig. 2). RecO alone or in concert with RecN and RecR partially displaces SsbA from ssDNA and promotes RecA loading onto SsbA-coated ssDNA (Kidane *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2006, 2008, Fig. 2; Carrasco *et al.*, 2008; Manfredi *et al.*, 2008). In *E. coli*, however, the loading of RecA onto the 3'-ssDNA ends relies on RecBCD or on RecOR(F) onto SSB-coated ssDNA in the absence of the former avenue (Umez & Kolodner, 1994; Shan *et al.*, 1997; Hobbs *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2008, Fig. 2). RecA partially disassembles the RecN rosette-like structures and forms discrete threads or filaments that search for homology along the sister chromosome located in the other cell half (two-ended DSBs) or in the neighborhood (one-ended DSBs) (Kidane & Graumann, 2005a; Sanchez *et al.*, 2006, 2008). When a homologous segment is found, the RecA nucleoprotein filament, in the presence of RecA modulators, promotes DNA strand invasion (D-loop intermediate) (Carrasco *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2008; Manfredi *et al.*, 2008). This substrate is then used by the replisome assembly proteins to load the hexameric replicative helicase. The activated helicase recruits DnaG and the replicase(s) (Bruand *et al.*, 2001, 2005; Rokop *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). At two-ended DSB, after second end capture, which could be mediated by RecO and DNA synthesis, a genuine double HJ is formed (Fig. 3). RecU modulates RecA activities by promoting RecA-catalysed strand invasion and by inhibiting RecA-mediated branch migration (Ayora *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2005, 2009; Cañas *et al.*, 2008). The branch migrating enzymes (RecG or RuvAB) promote strand exchange, and RecU/RuvC catalyzes the resolution of the HJ formed by recombination, leading to the full re-establishment of the replication fork (West, 2003; Robu *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2009). Alternatively, the double HJs are dissolved by Topo III in concert with a RecQ-like or a UvrD-like DNA helicase and the SsbA/SSB protein (Fig. 3). These functions are required to prevent the accumulation of chromosome dimers and/or dead-end recombination intermediates (Carrasco *et al.*, 2004). If DSB repair cannot be completed, the cell undergoes *unprogrammed cell death*, thus eliminating the possibility of passing on unrepaired genetic material. Indeed *recG*, *recU* and *ruvAB* cells show a fivefold reduction in their plating efficiency, while *recA* cells show a 10-fold reduction (Sanchez *et al.*, 2007a, c). In the absence of the RecA protein, limited processing by the NHEJ machinery can catalyze the joining of the two-ended DSBs (Fig. 2b) (Mascarenhas *et al.*, 2006). However, NHEJ can be mutagenic during vegetative growth. In the absence of a homologous DNA template, the role of NHEJ in two-ended DSB repair is more relevant, as occurs during the stationary phase (Weller *et al.*, 2002) or in spores (Wang *et al.*, 2006).

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2009-02907 and CSD2007-00010 and BFU2009-07167 from Ministerio de Ciencia e Innovación-Dirección General de Investigación to S.A. and J.C.A., respectively. We are grateful to Peter L. Graumann for the communication of unpublished results.

References

- Aguilera A & Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204–217.
- Akey D, Martins A, Anukwu J, Glickman MS, Shuman S & Berger JM (2006) Crystal structure and nonhomologous end-joining function of the ligase component of *Mycobacterium* DNA ligase D. *J Biol Chem* **281**: 13412–13423.
- Alonso JC & Luder G (1991) Characterization of recF suppressors in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **73**: 277–280.
- Alonso JC, Tailor RH & Luder G (1988) Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**: 3001–3007.
- Alonso JC, Luder G & Tailor RH (1991) Characterization of *Bacillus subtilis* recombinational pathways. *J Bacteriol* **173**: 3977–3980.
- Alonso JC, Stiege AC, Dobrinski B & Lurz R (1993a) Purification and properties of the RecR protein from *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem* **268**: 1424–1429.
- Alonso JC, Stiege AC & Luder G (1993b) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effect of *recN*, *recF*, *recH* and *addAB* mutations on DNA repair and recombination. *Mol Gen Genet* **239**: 129–136.
- Ambur OH, Davidsen T, Frye SA, Balasingham SV, Lagesen K, Rognes T & Tonjum T (2009) Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 453–470.
- Amundsen SK & Smith GR (2003) Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell* **112**: 741–744.
- Anand SP, Zheng H, Bianco PR, Leuba SH & Khan SA (2007) DNA helicase activity of PcrA is not required for the displacement of RecA protein from DNA or inhibition of RecA-mediated strand exchange. *J Bacteriol* **189**: 4502–4509.
- Anderson DG, Churchill JJ & Kowalczykowski SC (1999) A single mutation, RecB(D1080A), eliminates RecA protein loading but not Chi recognition by RecBCD enzyme. *J Biol Chem* **274**: 27139–27144.
- Au N, Kuester-Schoeck E, Mandava V *et al.* (2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol* **187**: 7655–7666.
- Aylon Y, Liefshitz B & Kupiec M (2004) The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* **23**: 4868–4875.
- Ayora S, Rojo F, Ogasawara N, Nakai S & Alonso JC (1996) The Mfd protein of *Bacillus subtilis* 168 is involved in both transcription-coupled DNA repair and DNA recombination. *J Mol Biol* **256**: 301–318.
- Ayora S, Stiege AC & Alonso JC (1997a) RecR is a zinc metalloprotein from *Bacillus subtilis* 168. *Mol Microbiol* **23**: 639–647.
- Ayora S, Stiege AC, Lurz R & Alonso JC (1997b) *Bacillus subtilis* 168 RecR protein–DNA complexes visualized as looped structures. *Mol Gen Genet* **254**: 54–62.
- Ayora S, Missich R, Mesa P, Lurz R, Yang S, Egelman EH & Alonso JC (2002) Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J Biol Chem* **277**: 35969–35979.
- Ayora S, Carrasco B, Doncel E, Lurz R & Alonso JC (2004) *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 452–457.
- Ayora S, Manfredi C, Cardenas P, Cañas C, Carrasco B & Alonso JC (2011) *DNA Repair and Bacterial Virulence*, (JR Penadés & J Barbé, eds). Horizon Scientific Press, Norwich.
- Bachrati CZ & Hickson ID (2008) RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* **117**: 219–233.
- Baker TA & Bell SP (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* **92**: 295–305.
- Baños B, Lazaro JM, Villar L, Salas M & de Vega M (2008) Characterization of a *Bacillus subtilis* 64-kDa DNA polymerase X potentially involved in DNA repair. *J Mol Biol* **384**: 1019–1028.
- Barzel A & Kupiec M (2008) Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* **9**: 27–37.
- Beam CE, Saveson CJ & Lovett ST (2002) Role for radA/sms in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6836–6844.
- Bentchikou E, Servant P, Coste G & Sommer S (2010) A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet* **6**: e1000774.
- Bowater R & Doherty AJ (2006) Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet* **2**: e8.
- Branzei D & Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**: 297–308.
- Brissett NC, Pitcher RS, Juarez R *et al.* (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science* **318**: 456–459.
- Bruand C, Farache M, McGovern S, Ehrlich SD & Polard P (2001) DnaB, DnaD and DnaI proteins are components of the *Bacillus subtilis* replication restart primosome. *Mol Microbiol* **42**: 245–255.
- Bruand C, Veltin M, McGovern S, Marsin S, Serena C, Ehrlich SD & Polard P (2005) Functional interplay between the *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins essential for initiation and re-initiation of DNA replication. *Mol Microbiol* **55**: 1138–1150.
- Bruck I & O'Donnell M (2000) The DNA replication machine of a Gram-positive organism. *J Biol Chem* **275**: 28971–28983.

- Bzymek M, Thayer NH, Oh SD, Kleckner N & Hunter N (2010) Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature* **464**: 937–941.
- Campoy S, Fontes M, Padmanabhan S, Cortes P, Llagostera M & Barbe J (2003) LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **49**: 769–781.
- Cañas C, Carrasco B, Ayora S & Alonso JC (2008) The RecU Holliday junction resolvase acts at early stages of homologous recombination. *Nucleic Acids Res* **36**: 5242–5249.
- Cao Z, Mueller CW & Julin DA (2010) Analysis of the *recJ* gene and protein from *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amsterdam)* **9**: 66–75.
- Cardenas PP, Carrasco B, Sanchez H, Deikus G, Bechhofer DH & Alonso JC (2009) *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase 3'-to-5' DNase activity is involved in DNA repair. *Nucleic Acids Res* **37**: 4157–4169.
- Carrasco B, Fernandez S, Petit MA & Alonso JC (2001) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effect of $\Delta helD$ on DNA repair and homologous recombination. *J Bacteriol* **183**: 5772–5777.
- Carrasco B, Fernandez S, Asai K, Ogasawara N & Alonso JC (2002) Effect of the *recU* suppressors *sms* and *subA* on DNA repair and homologous recombination in *Bacillus subtilis*. *Mol Genet Genomics* **266**: 899–906.
- Carrasco B, Cozar MC, Lurz R, Alonso JC & Ayora S (2004) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction-processing functions in chromosome segregation. *J Bacteriol* **186**: 5557–5566.
- Carrasco B, Ayora S, Lurz R & Alonso JC (2005) *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Res* **33**: 3942–3952.
- Carrasco B, Manfredi C, Ayora S & Alonso JC (2008) *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amsterdam)* **7**: 990–996.
- Carrasco B, Cañas C, Sharples GJ, Alonso JC & Ayora S (2009) The N-terminal region of the RecU Holliday junction resolvase is essential for homologous recombination. *J Mol Biol* **390**: 1–9.
- Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL & Kowalczykowski SC (2010a) DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* **467**: 112–116.
- Cejka P, Plank JL, Bachrati CZ, Hickson ID & Kowalczykowski SC (2010b) Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1377–1382.
- Chayot R, Montagne B, Mazel D & Ricchetti M (2010) An end-joining repair mechanism in *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci USA* **107**: 2141–2146.
- Chedin F, Handa N, Dillingham MS & Kowalczykowski SC (2006) The AddAB helicase/nuclease forms a stable complex with its cognate *chi* sequence during translocation. *J Biol Chem* **281**: 18610–18617.
- Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B & Bork P (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**: 1283–1287.
- Clark AJ & Sandler SJ (1994) Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit Rev Microbiol* **20**: 125–142.
- Claverys JP, Martin B & Polard P (2009) The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 643–656.
- Connelly JC & Leach DR (2002) Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11–Rad50 complex. *Trends Biochem Sci* **27**: 410–418.
- Courcelle J & Hanawalt PC (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet* **37**: 611–646.
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO & Hanawalt PC (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**: 41–64.
- Cox MM (2007a) Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat Rev Mol Cell Bio* **8**: 127–138.
- Cox MM (2007b) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol* **42**: 41–63.
- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ & Mariani KJ (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37–41.
- Cromie GA (2009) Phylogenetic ubiquity and shuffling of the bacterial RecBCD and AddAB recombination complexes. *J Bacteriol* **191**: 5076–5084.
- Cromie GA & Leach DR (2000) Control of crossing over. *Mol Cell* **6**: 815–826.
- Daley JM, Palmbos PL, Wu D & Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431–451.
- Darmon E, Lopez-Vernaza MA, Helness AC et al. (2007) SbcCD regulation and localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 6686–6694.
- Declais AC & Lilley DM (2008) New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 86–95.
- Dervyn E, Suski C, Daniel R et al. (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science* **294**: 1716–1719.
- Dervyn E, Noirot-Gros ME, Mervelet P, McGovern S, Ehrlich SD, Polard P & Noirot P (2004) The bacterial condensin/cohesin-like protein complex acts in DNA repair and regulation of gene expression. *Mol Microbiol* **51**: 1629–1640.
- Dillingham MS & Kowalczykowski SC (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol R* **72**: 642–671.
- Drees JC, Lusetti SL, Chittani-Pattu S, Inman RB & Cox MM (2004) A RecA filament capping mechanism for RecX protein. *Mol Cell* **15**: 789–798.
- Erill I, Campoy S & Barbe J (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 637–656.

- Eykelenboom JK, Blackwood JK, Okely E & Leach DR (2008) SbcCD causes a double-strand break at a DNA palindrome in the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Cell* **29**: 644–651.
- Fernández S, Rojo F & Alonso JC (1997) The *Bacillus subtilis* chromatin-associated protein Hbsu is involved in DNA repair and recombination. *Mol Microbiol* **23**: 1169–1179.
- Fernández S, Sorokin A & Alonso JC (1998) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of *recU* and *recS* mutations on DNA repair and homologous recombination. *J Bacteriol* **180**: 3405–3409.
- Fernández S, Kobayashi Y, Ogasawara N & Alonso JC (1999) Analysis of the *Bacillus subtilis* *recO* gene: RecO forms part of the RecFLOR function. *Mol Gen Genet* **261**: 567–573.
- Fernandez de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H & Woodgate R (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 1560–1572.
- Finch PW, Chambers P & Emmerson PT (1985) Identification of the *Escherichia coli* *recN* gene product as a major SOS protein. *J Bacteriol* **164**: 653–658.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA & Ellenberger T (2006) *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC.
- Fukui K, Nakagawa N, Kitamura Y, Nishida Y, Masui R & Kuramitsu S (2008) Crystal structure of MutS2 endonuclease domain and the mechanism of homologous recombination suppression. *J Biol Chem* **283**: 33417–33427.
- Fukushima S, Itaya M, Kato H, Ogasawara N & Yoshikawa H (2007) Reassessment of the *in vivo* functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *J Bacteriol* **189**: 8575–8583.
- Funayama T, Narumi I, Kikuchi M, Kitayama S, Watanabe H & Yamamoto K (1999) Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* **435**: 151–161.
- Gabbai CB & Marians KJ (2010) Recruitment to stalled replication forks of the PriA DNA helicase and replisome-loading activities is essential for survival. *DNA Repair (Amsterdam)* **9**: 202–209.
- Galletto R & Kowalczykowski SC (2007) RecA. *Curr Biol* **17**: R395–R397.
- Goranov AI, Kuester-Schoeck E, Wang JD & Grossman AD (2006) Characterization of the global transcriptional responses to different types of DNA damage and disruption of replication in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 5595–5605.
- Graumann PL & Knust T (2009) Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome Res* **17**: 265–275.
- Gravel S, Chapman JR, Magill C & Jackson SP (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* **22**: 2767–2772.
- Grifantini R, Frigimelica E, Delany I *et al.* (2004) Characterization of a novel *Neisseria meningitidis* Fur and iron-regulated operon required for protection from oxidative stress: utility of DNA microarray in the assignment of the biological role of hypothetical genes. *Mol Microbiol* **54**: 962–979.
- Grove JL, Wood SR, Briggs GS, Oldham NJ & Lloyd RG (2009) A soluble RecN homologue provides means for biochemical and genetic analysis of DNA double-strand break repair in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amsterdam)* **8**: 1434–1443.
- Gruber S & Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685–696.
- Gruenig MC, Stohl EA, Chittenden-Pattu S, Seifert HS & Cox MM (2010) Less is more: *Neisseria gonorrhoeae* RecX protein stimulates recombination by inhibiting RecA. *J Biol Chem* **285**: 37188–37197.
- Gupta R, Barkan D, Redelman-Sidi G, Shuman S & Glickman MS (2011) Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways. *Mol Microbiol* **79**: 316–330.
- Guthlein C, Wanner RM, Sander P, Bottger EC & Springer B (2008) A mycobacterial *smc* null mutant is proficient in DNA repair and long-term survival. *J Bacteriol* **190**: 452–456.
- Han ES, Cooper DL, Persky NS, Sutera VA Jr, Whitaker RD, Montello ML & Lovett ST (2006) RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res* **34**: 1084–1091.
- Handa N, Morimatsu K, Lovett ST & Kowalczykowski SC (2009) Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev* **23**: 1234–1245.
- Hansen MT (1978) Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *J Bacteriol* **134**: 71–75.
- Harmon FG, Rehrauer WM & Kowalczykowski SC (1996) Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. II. Inhibition of DNA strand exchange by the uncleavable LexA S119A repressor argues that recombination and SOS induction are competitive processes. *J Biol Chem* **271**: 23874–23883.
- Harper JW & Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**: 739–745.
- Haseltine CA & Kowalczykowski SC (2009) An archaeal Rad54 protein remodels DNA and stimulates DNA strand exchange by RadA. *Nucleic Acids Res* **37**: 2757–2770.
- Hayama R & Marians KJ (2010) Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci USA* **107**: 18826–18831.
- Heller RC & Marians KJ (2005) The disposition of nascent strands at stalled replication forks dictates the pathway of replisome loading during restart. *Mol Cell* **17**: 733–743.
- Hobbs MD, Sakai A & Cox MM (2007) SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J Biol Chem* **282**: 11058–11067.
- Holliday R (1967) Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of *Ustilago*. *Mutat Res* **4**: 275–288.

- Hollingsworth NM & Brill SJ (2004) The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* **18**: 117–125.
- Hopfner KP & Tainer JA (2003) Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 249–255.
- Hopkins BB & Paull TT (2008) The *P. furiosus mre11/rad50* complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell* **135**: 250–260.
- Huertas P & Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**: 9558–9565.
- Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A & Jackson SP (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **455**: 689–692.
- Ioannou C, Schaeffer PM, Dixon NE & Soultanas P (2006) Helicase binding to DnaI exposes a cryptic DNA-binding site during helicase loading in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **34**: 5247–5258.
- Ira G, Pelliccioli A, Balijia A *et al.* (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**: 1011–1017.
- Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J & Haber JE (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**: 693–704.
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V & Modrich PL (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* **106**: 302–323.
- Jin H, Retallack DM, Stelman SJ, Hershberger CD & Ramseier T (2007) Characterization of the SOS response of *Pseudomonas fluorescens* strain DC206 using whole-genome transcript analysis. *FEMS Microbiol Lett* **269**: 256–264.
- Jordan PW & Saunders NJ (2009) Host iron binding proteins acting as niche indicators for *Neisseria meningitidis*. *PLoS One* **4**: e5198.
- Kaimer C, Gonzalez-Pastor JE & Graumann PL (2009) SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **74**: 810–825.
- Kang J & Blaser MJ (2008) Repair and antirepair DNA helicases in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **190**: 4218–4224.
- Katayama T, Ozaki S, Keyamura K & Fujimitsu K (2010) Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat Rev Microbiol* **8**: 163–170.
- Khil PP & Camerini-Otero RD (2002) Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 89–105.
- Kickstein E, Harms K & Wackernagel W (2007) Deletions of *recBCD* or *recD* influence genetic transformation differently and are lethal together with a *recJ* deletion in *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology* **153**: 2259–2270.
- Kidane D & Graumann PL (2005a) Dynamic formation of RecA filaments at DNA double strand break repair centers in live cells. *J Cell Biol* **170**: 357–366.
- Kidane D & Graumann PL (2005b) Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* **122**: 73–84.
- Kidane D, Sanchez H, Alonso JC & Graumann PL (2004) Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Mol Microbiol* **52**: 1627–1639.
- Kidane D, Carrasco B, Manfredi C *et al.* (2009) Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS Genet* **5**: e1000630.
- Kim JI, Sharma AK, Abbott SN *et al.* (2002) RecA protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization. *J Bacteriol* **184**: 1649–1660.
- Kitten T & Barbour AG (1992) The relapsing fever agent *Borrelia hermsii* has multiple copies of its chromosome and linear plasmids. *Genetics* **132**: 311–324.
- Klein HL & Symington LS (2009) Breaking up just got easier to do. *Cell* **138**: 20–22.
- Kogoma T (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol R* **61**: 212–238.
- Komaki K & Ishikawa H (1999) Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. *J Mol Evol* **48**: 717–722.
- Kosa JL, Zdraveski ZZ, Currier S, Marinus MG & Essigmann JM (2004) RecN and RecG are required for *Escherichia coli* survival of Bleomycin-induced damage. *Mutat Res* **554**: 149–157.
- Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD & Rehauer WM (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 401–465.
- Kreuzer KN (2005) Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **59**: 43–67.
- Krishnamurthy M, Tadesse S, Rothmaier K & Graumann PL (2010) A novel SMC-like protein, SbcE (YhaN), is involved in DNA double-strand break repair and competence in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **38**: 455–466.
- Krogh BO & Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233–271.
- Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . *Microbiol Mol Biol R* **63**: 751–813.
- Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N *et al.* (2007) The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococcus Lactococci*. *PLoS Genet* **3**: e117.
- Lecointe F, Serena C, Velten M *et al.* (2007) Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *EMBO J* **26**: 4239–4251.
- Lee BI, Kim KH, Park SJ, Eom SH, Song HK & Suh SW (2004) Ring-shaped architecture of RecR: implications for its role in

- homologous recombinational DNA repair. *EMBO J* **23**: 2029–2038.
- Li Y, Stewart NK, Berger AJ *et al.* (2010) *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *P Natl Acad Sci USA* **107**: 18832–18837.
- Liang F, Han M, Romanienko PJ & Jasin M (1998) Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *P Natl Acad Sci USA* **95**: 5172–5177.
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 181–211.
- Lilley DM & White MF (2000) Resolving the relationships of resolving enzymes. *P Natl Acad Sci USA* **97**: 9351–9353.
- Lindow JC, Kuwano M, Moriya S & Grossman AD (2002) Subcellular localization of the *Bacillus subtilis* structural maintenance of chromosomes (SMC) protein. *Mol Microbiol* **46**: 997–1009.
- Lisby M & Rothstein R (2004) DNA damage checkpoint and repair centers. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 328–334.
- Little JW (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**: 411–421.
- Llorente B, Smith CE & Symington LS (2008) Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle* **7**: 859–864.
- Lloyd RG & Buckman C (1995) Conjugational recombination in *Escherichia coli*: genetic analysis of recombinant formation in Hfr x F⁻ crosses. *Genetics* **139**: 1123–1148.
- Lohman TM & Ferrari ME (1994) *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu Rev Biochem* **63**: 527–570.
- Lopez CR, Yang S, Deibler RW *et al.* (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol* **58**: 80–101.
- López-Torrejón G, Martínez-Jiménez MI & Ayora S (2006) Role of LrpC from *Bacillus subtilis* in DNA transactions during DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Res* **34**: 120–129.
- Lovett CM Jr & Roberts JW (1985) Purification of a RecA protein analogue from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **260**: 3305–3313.
- Lucarelli D, Wang YA, Galkin VE, Yu X, Wigley DB & Egelman EH (2009) The RecB nuclease domain binds to RecA-DNA filaments: implications for filament loading. *J Mol Biol* **391**: 269–274.
- Lusetti SL & Cox MM (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem* **71**: 71–100.
- Lusetti SL, Hobbs MD, Stohl EA, Chittani-Pattu S, Inman RB, Seifert HS & Cox MM (2006) The RecF protein antagonizes RecX function via direct interaction. *Mol Cell* **21**: 41–50.
- Manfredi C, Carrasco B, Ayora S & Alonso JC (2008) *Bacillus subtilis* RecO nucleates RecA onto SsbA-coated single-stranded DNA. *J Biol Chem* **283**: 24837–24847.
- Manfredi C, Suzuki Y, Yadav T, Takeyasu K & Alonso JC (2010) RecO-mediated DNA homology search and annealing is facilitated by SsbA. *Nucleic Acids Res* **38**: 6920–6929.
- Marians KJ (2004) Mechanisms of replication fork restart in *Escherichia coli*. *Philos T Roy Soc B* **359**: 71–77.
- Marsin S, McGovern S, Ehrlich SD, Bruand C & Polard P (2001) Early steps of *Bacillus subtilis* primosome assembly. *J Biol Chem* **276**: 45818–45825.
- Marsin S, Lopes A, Mathieu A, Dizet E, Orillard E, Guerois R & Radicella JP (2010) Genetic dissection of *Helicobacter pylori* AddAB role in homologous recombination. *FEMS Microbiol Lett* **311**: 44–50.
- Martínez-Jiménez MI, Alonso JC & Ayora S (2005) *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein. *J Mol Biol* **351**: 1007–1019.
- Mascarenhas J, Soppa J, Strunnikov AV & Graumann PL (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J* **21**: 3108–3118.
- Mascarenhas J, Volkov AV, Rinn C, Schiener J, Guckenberger R & Graumann PL (2005) Dynamic assembly, localization and proteolysis of the *Bacillus subtilis* SMC complex. *BMC Cell Biol* **6**: 28.
- Mascarenhas J, Sanchez H, Tadesse S, Kidane D, Krishnamurthy M, Alonso JC & Graumann PL (2006) *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC Mol Biol* **7**: 20.
- McEachern MJ & Haber JE (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem* **75**: 111–135.
- McGlynn P & Lloyd RG (2002a) Genome stability and the processing of damaged replication forks by RecG. *Trends Genet* **18**: 413–419.
- McGlynn P & Lloyd RG (2002b) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Bio* **3**: 859–870.
- McGregor N, Ayora S, Sedelnikova S, Carrasco B, Alonso JC, Thaw P & Rafferty J (2005) The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure* **13**: 1341–1351.
- Meddows TR, Savory AP & Lloyd RG (2004) RecG helicase promotes DNA double-strand break repair. *Mol Microbiol* **52**: 119–132.
- Meddows TR, Savory AP, Grove JJ, Moore T & Lloyd RG (2005) RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Mol Microbiol* **57**: 97–110.
- Messer W (2002) The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 355–374.
- Michel B, Grompone G, Flores MJ & Bidnenko V (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 12783–12788.

- Michel B, Boubakri H, Baharoglu Z, LeMasson M & Lestini R (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amsterdam)* **6**: 967–980.
- Mimitou EP & Symington LS (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**: 770–774.
- Mimitou EP & Symington LS (2009a) Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci* **34**: 264–272.
- Mimitou EP & Symington LS (2009b) DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amsterdam)* **8**: 983–995.
- Mirkin EV & Mirkin SM (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol R* **71**: 13–35.
- Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G *et al.* (2007) Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol* **189**: 3306–3311.
- Moeller R, Setlow P, Horneck G *et al.* (2008) Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from X rays and high-energy charged-particle bombardment. *J Bacteriol* **190**: 1134–1140.
- Montague M, Barnes C, Smith HO, Chuang RY & Vashee S (2009) The evolution of RecD outside of the RecBCD complex. *J Mol Evol* **69**: 360–371.
- Mortensen UH, Bendixen C, Sunjevaric I & Rothstein R (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 10729–10734.
- Nagashima K, Kubota Y, Shibata T, Sakaguchi C, Shinagawa H & Hishida T (2006) Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *J Biol Chem* **281**: 30941–30946.
- Neher SB, Villen J, Oakes EC, Bakalarski CE, Sauer RT, Gygi SP & Baker TA (2006) Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell* **22**: 193–204.
- Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E *et al.* (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* **25**: 350–362.
- Niu H, Raynard S & Sung P (2009) Multiplicity of DNA end resection machineries in chromosome break repair. *Genes Dev* **23**: 1481–1486.
- Niu H, Chung WH, Zhu Z *et al.* (2010) Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **467**: 108–111.
- Noirot P & Noirot-Gros MF (2004) Protein interaction networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **7**: 505–512.
- Noirot P, Polard P & Noirot-Gros M-F (2007) *Replication of the Bacillus subtilis chromosome*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Nuñez-Ramírez R, Velten M, Rivas G, Polard P, Carazo JM & Donate LE (2007) Loading a ring: structure of the *Bacillus subtilis* DnaB protein, a co-loader of the replicative helicase. *J Mol Biol* **367**: 764–769.
- O'Donnell M (2006) Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 10653–10656.
- Osman F, Dixon J, Doe CL & Whitby MC (2003) Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* **12**: 761–774.
- Osman F, Gaskell L & Whitby MC (2009) Efficient second strand cleavage during Holliday junction resolution by RuvC requires both increased junction flexibility and an exposed 5' phosphate. *PLoS One* **4**: e5347.
- Pàques F & Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol R* **63**: 349–404.
- Parrish JR, Yu J, Liu G *et al.* (2007) A proteome-wide protein interaction map for *Campylobacter jejuni*. *Genome Biol* **8**: R130.
- Patel M, Jiang Q, Woodgate R, Cox MM & Goodman MF (2010) A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit Rev Biochem Mol* **45**: 171–184.
- Pedersen LB & Setlow P (2000) Penicillin-binding protein-related factor A is required for proper chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**: 1650–1658.
- Persky NS & Lovett ST (2008) Mechanisms of recombination: lessons from *E. coli*. *Crit Rev Biochem Mol* **43**: 347–370.
- Petit MA (2005) *Mechanisms of homologous recombination in bacteria*. Cambridge University press, Cambridge.
- Petit MA & Ehrlich D (2002) Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins. *EMBO J* **21**: 3137–3147.
- Picksley SM, Attfield PV & Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional *recN* product. *Mol Gen Genet* **195**: 267–274.
- Pinto AV, Mathieu A, Marsin S, Veaute X, Ielpi L, Labigne A & Radicella JP (2005) Suppression of homologous and homeologous recombination by the bacterial MutS2 protein. *Mol Cell* **17**: 113–120.
- Pitcher RS, Brissett NC & Doherty AJ (2007) Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol* **61**: 259–282.
- Polard P, Marsin S, McGovern S, Velten M, Wigley DB, Ehrlich SD & Bruand C (2002) Restart of DNA replication in Gram-positive bacteria: functional characterisation of the *Bacillus subtilis* PriA initiator. *Nucleic Acids Res* **30**: 1593–1605.
- Porwollik S, Frye J, Florea LD, Blackmer F & McClelland M (2003) A non-redundant microarray of genes for two related bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**: 1869–1876.
- Postow L, Hardy CD, Arsuaga J & Cozzarelli NR (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* **18**: 1766–1779.
- Ptacin JL, Nollmann M, Becker EC, Cozzarelli NR, Pogliano K & Bustamante C (2008) Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 485–493.

- Reyes ED, Patidar PL, Uranga LA, Bortoletto AS & Lusetti SL (2010) RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions *in vitro*. *J Biol Chem* **285**: 16521–16529.
- Rigden DJ (2005) An inactivated nuclease-like domain in RecC with novel function: implications for evolution. *BMC Struct Biol* **5**: 9.
- Robu ME, Inman RB & Cox MM (2004) Situational repair of replication forks: roles of RecG and RecA proteins. *J Biol Chem* **279**: 10973–10981.
- Rocha EP, Cornet E & Michel B (2005) Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet* **1**: e15.
- Rokop ME, Auchtung JM & Grossman AD (2004) Control of DNA replication initiation by recruitment of an essential initiation protein to the membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **52**: 1757–1767.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH & Lobrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 5706–5715.
- Rudolph CJ, Upton AL, Briggs GS & Lloyd RG (2010) Is RecG a general guardian of the bacterial genome? *DNA Repair (Amsterdam)* **9**: 210–223.
- Sancar A & Reardon JT (2004) Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* **69**: 43–71.
- Sanchez H & Alonso JC (2005) *Bacillus subtilis* RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res* **33**: 2343–2350.
- Sanchez H, Kidane D, Reed P *et al.* (2005) The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **171**: 873–883.
- Sanchez H, Kidane D, Cozar MC, Graumann PL & Alonso JC (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J Bacteriol* **188**: 353–360.
- Sanchez H, Carrasco B, Ayora S & Alonso JC (2007a) *Dynamics of DNA Double-Strand Break Repair in Bacillus subtilis*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Sanchez H, Carrasco B, Cozar MC & Alonso JC (2007b) *Bacillus subtilis* RecG branch migration translocase is required for DNA repair and chromosomal segregation. *Mol Microbiol* **65**: 920–935.
- Sanchez H, Carrasco B, Ayora S & Alonso JC (2007c) *Homologous recombination in low dC+dG Gram-positive bacteria*. Springer Berlin/Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sanchez H, Cardenas PP, Yoshimura SH, Takeyasu K & Alonso JC (2008) Dynamic structures of *Bacillus subtilis* RecN–DNA complexes. *Nucleic Acids Res* **36**: 110–120.
- Sander C & Schneider R (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**: 56–68.
- Sanders GM, Dallmann HG & McHenry CS (2010) Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replisomes. *Mol Cell* **37**: 273–281.
- Sandler SJ (2000) Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **155**: 487–497.
- San Filippo J, Sung P & Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229–257.
- Sargentini NJ & Smith KC (1986) Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiat Res* **107**: 58–72.
- Sassanfar M & Roberts JW (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**: 79–96.
- Schook PO, Stohl EA, Criss AK & Seifert HS (2011) The DNA-binding activity of the *Neisseria gonorrhoeae* LexA orthologue NG1427 is modulated by oxidation. *Mol Microbiol* **79**: 846–860.
- Sebastian S, Agarwal S, Murphy JR & Genco CA (2002) The gonococcal fur regulon: identification of additional genes involved in major catabolic, recombination, and secretory pathways. *J Bacteriol* **184**: 3965–3974.
- Sechman EV, Kline KA & Seifert HS (2006) Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. *Mol Microbiol* **61**: 185–193.
- Shan Q, Bork JM, Webb BL, Inman RB & Cox MM (1997) RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *J Mol Biol* **265**: 519–540.
- Sharples GJ (2001) The X philes: structure-specific endonucleases that resolve Holliday junctions. *Mol Microbiol* **39**: 823–834.
- Sharples GJ (2009) For absent friends: life without recombination in mutualistic γ -Proteobacteria. *Trends Microbiol* **17**: 233–242.
- Shereda RD, Kozlov AG, Lohman TM, Cox MM & Keck JL (2008) SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit Rev Biochem Mol* **43**: 289–318.
- Sherratt DJ (2003) Bacterial chromosome dynamics. *Science* **301**: 780–785.
- Shintomi K & Hirano T (2007) How are cohesin rings opened and closed? *Trends Biochem Sci* **32**: 154–157.
- Shuman S & Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* **5**: 852–861.
- Simmons LA, Grossman AD & Walker GC (2007) Replication is required for the RecA localization response to DNA damage in *Bacillus subtilis*. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 1360–1365.
- Simmons LA, Goranov AI, Kobayashi H, Davies BW, Yuan DS, Grossman AD & Walker GC (2009) Comparison of responses to double-strand breaks between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* reveals different requirements for SOS induction. *J Bacteriol* **191**: 1152–1161.
- Singleton MR, Dillingham MS & Wigley DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* **76**: 23–50.
- Sinha KM, Stephanou NC, Gao F, Glickman MS & Shuman S (2007) Mycobacterial UvrD1 is a Ku-dependent DNA helicase

- that plays a role in multiple DNA repair events, including double-strand break repair. *J Biol Chem* **282**: 15114–15125.
- Sinha KM, Stephanou NC, Unciuleac MC, Glickman MS & Shuman S (2008) Domain requirements for DNA unwinding by mycobacterial UvrD2, an essential DNA helicase. *Biochemistry* **47**: 9355–9364.
- Sinha KM, Unciuleac MC, Glickman MS & Shuman S (2009) AdnAB: a new DSB-resecting motor-nuclease from mycobacteria. *Genes Dev* **23**: 1423–1437.
- Skaar EP, Lazio MP & Seifert HS (2002) Roles of the *recJ* and *recN* genes in homologous recombination and DNA repair pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **184**: 919–927.
- Smits WK, Goranov AI & Grossman AD (2010) Ordered association of helicase loader proteins with the *Bacillus subtilis* origin of replication *in vivo*. *Mol Microbiol* **75**: 452–461.
- Steffen SE & Bryant FR (1999) Reevaluation of the nucleotide cofactor specificity of the RecA protein from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **274**: 25990–25994.
- Stohl EA & Seifert HS (2006) *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **188**: 7645–7651.
- Stohl EA, Brockman JP, Burkle KL, Morimatsu K, Kowalczykowski SC & Seifert HS (2003) *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **278**: 2278–2285.
- Stohl EA, Criss AK & Seifert HS (2005) The transcriptome response of *Neisseria gonorrhoeae* to hydrogen peroxide reveals genes with previously uncharacterized roles in oxidative damage protection. *Mol Microbiol* **58**: 520–532.
- Su C, Peregrin-Alvarez JM, Butland G, Phanse S, Fong V, Emili A & Parkinson J (2008) Bacteriome.org. an integrated protein interaction database for *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **36**: D632–D636.
- Sweetman WA, Moxon ER & Bayliss CD (2005) Induction of the SOS regulon of *Haemophilus influenzae* does not affect phase variation rates at tetranucleotide or dinucleotide repeats. *Microbiology* **151**: 2751–2763.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ & Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25–35.
- Tadesse S, Mascarenhas J, Kusters B, Hasilik A & Graumann PL (2005) Genetic interaction of the SMC complex with topoisomerase IV in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 3729–3737.
- Thoms B, Borchers I & Wackernagel W (2008) Effects of single-strand DNases ExoI, RecJ, ExoVII, and SbcCD on homologous recombination of *recBCD*⁺ strains of *Escherichia coli* and roles of SbcB15 and XonA2 ExoI mutant enzymes. *J Bacteriol* **190**: 179–192.
- Tobiason DM & Seifert HS (2006) The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. *PLoS Biol* **4**: e185.
- Tobiason DM & Seifert HS (2010) Genomic content of *Neisseria* species. *J Bacteriol* **192**: 2160–2168.
- Tomita K, Matsuura A, Caspari T et al. (2003) Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for ExoI in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol Cell Biol* **23**: 5186–5197.
- Umez K & Kolodner RD (1994) Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 30005–30013.
- Umez K & Nakayama H (1993) RecQ DNA helicase of *Escherichia coli*. Characterization of the helix-unwinding activity with emphasis on the effect of single-stranded DNA-binding protein. *J Mol Biol* **230**: 1145–1150.
- Umez K, Chi NW & Kolodner RD (1993) Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *P Natl Acad Sci USA* **90**: 3875–3879.
- Unciuleac MC & Shuman S (2010) Characterization of the mycobacterial AdnAB DNA motor provides insights into the evolution of bacterial motor-nuclease machines. *J Biol Chem* **285**: 2632–2641.
- Veaute X, Delmas S, Selva M et al. (2005) UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J* **24**: 180–189.
- Velten M, McGovern S, Marsin S, Ehrlich SD, Noirot P & Polard P (2003) A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell* **11**: 1009–1020.
- Viret JF, Bravo A & Alonso JC (1991) Recombination-dependent concatemeric plasmid replication. *Microbiol Rev* **55**: 675–683.
- Wang G & Maier RJ (2008) Critical role of RecN in recombinational DNA repair and survival of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **76**: 153–160.
- Wang J & Julin DA (2004) DNA helicase activity of the RecD protein from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* **279**: 52024–52032.
- Wang ST, Setlow B, Conlon EM et al. (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **358**: 16–37.
- Wang TC, Chang HY & Hung JL (1993) Cosuppression of *recF*, *recR* and *recO* mutations by mutant *recA* alleles in *Escherichia coli* cells. *Mutat Res* **294**: 157–166.
- Wasko BM, Holland CL, Resnick MA & Lewis LK (2009) Inhibition of DNA double-strand break repair by the Ku heterodimer in *mrX* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amsterdam)* **8**: 162–169.
- Webb BL, Cox MM & Inman RB (1995) An interaction between the *Escherichia coli* RecF and RecR proteins dependent on ATP and double-stranded DNA. *J Biol Chem* **270**: 31397–31404.
- Weiner A, Zauberman N & Minsky A (2009) Recombinational DNA repair in a cellular context: a search for the homology search. *Nat Rev Microbiol* **7**: 748–755.
- Weller GR, Kysela B, Roy R et al. (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**: 1686–1689.
- Wen Q, Mahdi AA, Briggs GS, Sharples GJ & Lloyd RG (2005) Conservation of RecG activity from pathogens to hyperthermophiles. *DNA Repair (Amsterdam)* **4**: 23–31.

- West SC (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet* **31**: 213–244.
- West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Bio* **4**: 435–445.
- Wu L, Karow JK & Hickson ID (1999) Genetic recombination: helicases and topoisomerases link up. *Curr Biol* **9**: R518–R520.
- Wyman C, Ristic D & Kanaar R (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amsterdam)* **3**: 827–833.
- Yeeles JT & Dillingham MS (2010) The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase–nuclease complexes. *DNA Repair (Amsterdam)* **9**: 276–285.
- Yeeles JT, Cammack R & Dillingham MS (2009) An iron–sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase–nucleases. *J Biol Chem* **284**: 7746–7755.
- Zahradka K, Slade D, Bailone A *et al.* (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* **443**: 569–573.
- Zhang W, Carneiro MJ, Turner IJ, Allen S, Roberts CJ & Soultanas P (2005) The *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins exhibit different DNA remodelling activities. *J Mol Biol* **351**: 66–75.
- Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA & Storz G (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562–4570.
- Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE & Ira G (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**: 981–994.



The Stalk Region of the RecU Resolvase Is Essential for Holliday Junction Recognition and Distortion

Cristina Cañas¹, Begoña Carrasco¹, Esther García-Tirado¹,
John B. Rafferty², Juan C. Alonso¹ and Silvia Ayora^{1*}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

²Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, UK

Received 18 March 2011;
received in revised form
4 May 2011;
accepted 5 May 2011

Edited by J. Karn

Keywords:

Holliday junction resolvases;
Hjc;
RecU;
RuvB;
RecA

The *Bacillus subtilis* RecU protein has two activities: to recognize, distort, and cleave four-stranded recombination intermediates and to modulate RecA activities. The RecU structure shows a mushroom-like appearance, with a cap and a stalk region. The RuvB interaction and the catalytic residues are located in the cap region of dimeric RecU. We report here that the stalk region is essential not only for RecA modulation but also for Holliday junction (HJ) recognition. Two *recU* mutants, which map in the stalk region, were isolated and characterized. *In vivo*, a RecU variant with a Phe81-to-Ala substitution (F81A) was as sensitive to DNA-damaging agents as a null *recU* strain, and a similar substitution at tyrosine 80 (Y80A) showed an intermediate phenotype. RecUY80A and RecUF81A poorly recognize and distort HJs. RecUY80A cleaves HJs with low efficiency, and RuvB modulates cleavage. At high concentrations, RecUF81A binds to HJs but fails to cleave them. Unlike wild-type RecU, RecUY80A and RecUF81A do not inhibit RecA dATPase and strand-exchange activities. The RecU stalk region is involved in RecA interaction, but once an HJ is bound, RecU fails to modulate RecA activities. Our biochemical study provides a mechanistic basis for the connections between these two mutually exclusive stages (i.e., RecA modulation and HJ resolution) of the recombination reaction.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

At the postsynaptic stage of homologous recombination (HR), Holliday junction (HJ) resolving enzymes, in the presence of divalent cations, transform a four-stranded DNA intermediate¹ into two duplex molecules by introducing pairs of nicks flanking the junction.^{2,3} This fundamental process is common to cells from all domains of life.^{4,5} Structure-specific HJ resolving enzymes with five different folds have been described. The bacterial enzymes, which are almost ubiquitous, comprise members of the integrase superfamily (e.g., *Escherichia coli* RuvC) or members of the restriction endonuclease superfamily (e.g., *Bacillus subtilis* RecU).^{2,6} Despite their differences in structural

*Corresponding author. E-mail address: sayora@cnb.csic.es.

Abbreviations used: HJ, Holliday junction; HR, homologous recombination; RecU_{Bst}, *Bacillus stearothermophilus* RecU; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; wt, wild type; dsDNA, double-stranded DNA; ssDNA, single-stranded DNA; MMS, methylmethane sulfonate; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; dPAGE, denaturing PAGE; MICINN, Ministerio de Ciencia e Innovación.

fold, members of both families bind, distort, and cleave HJs as dimers and work in concert with the RuvAB branch migration translocase. However, other members of these families, such as *Saccharomyces cerevisiae* CCE1 (integrase superfamily) or the phage T7 Endo I and the archaeal Hjc enzymes (nuclease superfamily), do not have an obvious connection with a RuvAB-like translocase, which seems to be restricted to bacterial resolvases. There are three other families of HJ resolving enzymes: two of them are encoded by bacterial viruses, that is, RusA (encoded by the cryptic DLP12 prophage and present in numerous phages) and Endo VII of phage T4 (belonging to the HNH endonuclease family), whereas the third family is encoded by eukaryotic cells and has the XPG nuclease fold (represented by human GEN1 and yeast Yen1).^{3,5,7} Although the bacteria-encoded HJ resolvases may not show any sequence or structural homology

among them, they carry out a similar function; for example, *B. subtilis* RecU, which forms religatable nicked duplex products, can partially substitute for RuvC in *E. coli* cells.⁸ Note that hence forward in this article, the indicated genes and products are of *B. subtilis* origin, unless stated otherwise.

The dimeric RecU protein (monomer size, 206 residues) shares structural similarity with the small archaeal Hjc (monomer size, 123 residues) and bacteriophage T7 Endo I (monomer size, 149 residues) HJ resolving enzymes.^{6,9–11} The RecU structure shows a mushroom-like appearance, with a cap and a stalk region^{6,12,13} (Fig. 1b). The catalytically critical residues (E36, D88, E101, and K103) are located in the cap region at the dimer interface^{6,12} (Fig. 1b). The N-terminus of RecU (residues 1–33, including the conserved 30-NRGM-33 tetrad), which was not visible in the electron density maps, is essential for protein activity

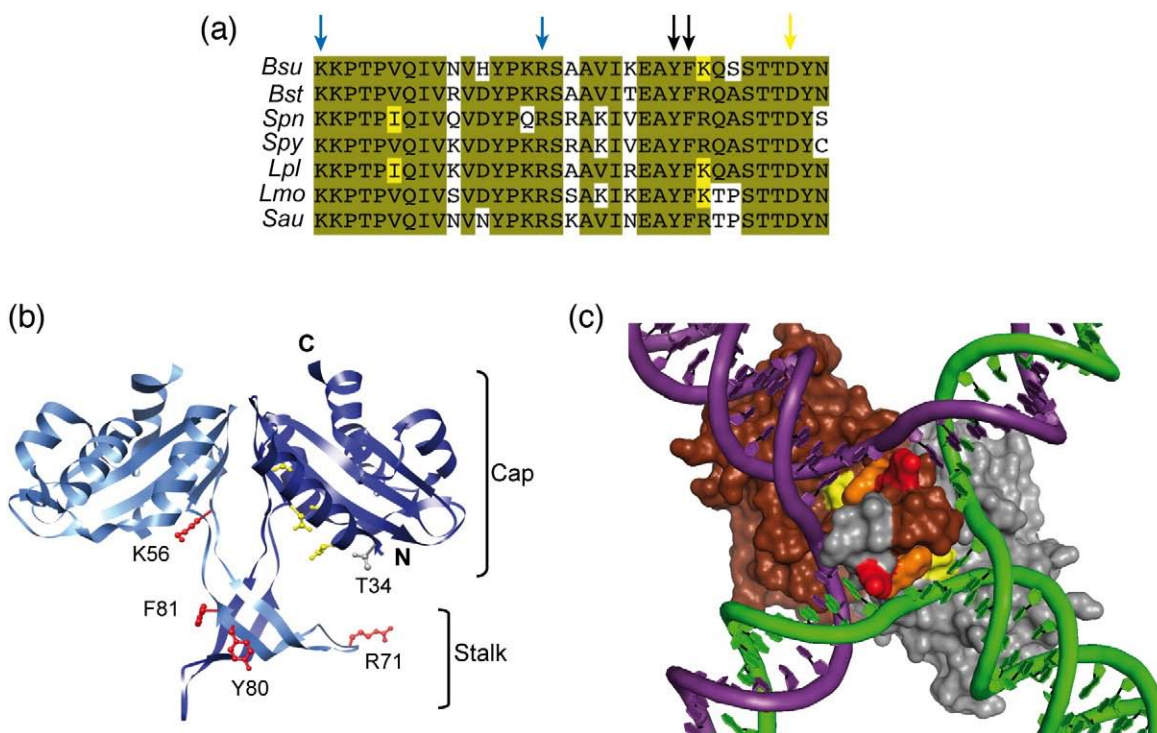


Fig. 1. Conservation of mutated residues and their localization in the *B. stearothermophilus* RecU X-ray structure. (a) Sequence alignment of the stalk region from several RecU proteins from Firmicutes. *Bsu*, *B. subtilis*; *Bst*, *B. stearothermophilus*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*; *Spy*, *Streptococcus pyogenes*; *Lpl*, *Lactobacillus plantarum*; *Lmo*, *Listeria monocytogenes*; *Sau*, *Staphylococcus aureus*. The tail region comprises residues 56–89 in RecU (Protein Data Bank ID: 1ZP7). Black arrows indicate the mutated residues. The yellow arrow shows a catalytic residue (D88), and the blue arrows show previously studied residues in the stalk region. Identical residues are highlighted in green, and conserved residues are highlighted in yellow. (b) Location of mutated residues in the X-ray structure of *B. stearothermophilus* RecU (Protein Data Bank ID: 1Y1O). Residues analyzed in this study are located in this structure since the tail region could be resolved, although residue numbers correspond to the *B. subtilis* RecU protein. For simplicity, the residues of the stalk region that have been analyzed are shown only in one monomer and in red. The catalytic residues are shown in yellow in the other monomer (E36, D88, D99, and E101). The location of the first observed amino acid from the N-terminus (T34) is shown in gray. (c) A model for a RecU dimer (surface representation with monomers shown in brown and gray) bound to a 4-fold-symmetric HJ, where the phosphate backbone is shown as a tube. The active-site residues of the protein have been highlighted in yellow, and the Y80 and F81 residues are shown in red and orange, respectively. The figure was produced using PyMOL.

because RecU Δ 1–32 forms unstable complexes with DNA and fails to cleave HJs.¹⁴ Furthermore, it has been shown that R31 (located in the conserved 30-NRGM-33 tetrad) is essential for RuvB interaction.¹⁴ The stalk region, which is highly conserved among RecU-like resolvases but is absent in the other members of the nuclease superfamily, is required for the interaction with RecA^{14,15} (Fig. 1a), and it was proposed to be involved in the interaction with an HJ⁶ (Fig. 1c). In all mutants impaired in HJ resolution, the frequency of anucleate cells (or accumulation of nonsegregated chromosomes) increases 90-fold to 110-fold.^{16,17} Consistent with this, mutations at residues K56 (K56A) and R71 (R71A) of the stalk region (Fig. 1b), which *in vitro* are able to cleave HJs and to interact with RuvB, are proficient in chromosomal segregation *in vivo*. The RecUK56A and RecUR71A mutations are very sensitive to DNA-damaging agents and are impaired in plasmid transformation. *In vitro*, they do not negatively modulate RecA activities, supporting an early role for RecU in HR.^{15,18,19} Although the activities of RecU at the early and late stages of HR can be genetically separated, they seem to be interlinked. Indeed, the conserved K56, which is essential for RecA modulation, is seen adjacent to the catalytic residue D88 and has been implicated in the proper positioning of the catalytic triad,^{6,12} suggesting that K56 might impose some kind of regulation during catalysis.

In the presence of Mg²⁺, the HJ shows a dynamic exchange between stacking conformers, with an open unstacked structure used as an intermediate in their interconversion.⁷ In general, HJ resolving enzymes both recognize and distort the structure of the junction as a step prior to cleavage. RecU, in the presence of physiological levels of Mg²⁺, binds specifically to the HJ, which then adopts an unstacked arrangement.⁶ The RecU stalk region was not fully visible in our structure⁶ but was visible in the structure of *Bacillus stearothermophilus* RecU (RecU_{Bst}), which crystallizes as a dimer of dimers.¹³ We proposed a model of RecU bound to an HJ DNA in a square planar conformation, where the central hole formed in the HJ might accommodate the stalk region and where pairs of arms of the junction are positioned near both active sites⁶ (Fig. 1c). If the stalk region protrudes through the inside of the HJ, some residues of the stalk region, such as aromatic F80 and Y81 residues, would possibly interact with the incoming bases of the HJ, and the RecA interaction, through the previously identified residues K56 and/or R71, might also be hindered. To test this hypothesis, we have mutated these two aromatic and conserved residues of the stalk region (Fig. 1a) to alanine and performed *in vivo* and *in vitro* assays to assess the effect of these mutations. This work shows that: (i) the interaction of RecU with the HJ and with RecA is mutually exclusive; and (ii)

aromatic residues in the stalk region are essential for HJ recognition and distortion, supporting our model of how the RecU HJ resolvases recognize and bind to the HJ DNA.

Results

recU81 mutant is impaired in plasmid transformation and proper chromosome segregation

RecU has two activities: in concert with RuvAB, it catalyzes the resolution of HJs, and, alone, it modulates RecA activities.^{8,14,15,18,20} Molecular modeling predicted that two aromatic residues (Y80 and/or F81) present in the stalk region of Firmicutes RecU should be essential for HJ recognition and subsequent distortion and might also affect the modulation of the RecA activities. To test these hypotheses, we used site-directed alanine mutagenesis to generate *recU* mutants of these aromatic residues (*recU80* [RecUY80A] and *recU81* [RecUF81A]). If the mutants are involved in HJ binding and/or recognition, they will show a deficiency in chromosomal segregation because unprocessed HJs will accumulate during normal growth. However, if they are also involved in RecA interaction, a defect in plasmid transformation should be observed (see Introduction). The frequency of anucleate cells [measured as the absence of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained material] is very low in exponentially growing wild-type (wt) cells (~0.05% of total cells), whereas this frequency of anucleates (or accumulation of nonsegregated chromosomes) is ~4% in Δ *ruvAB*⁸ or Δ *recU* cells.^{16,17} The frequency of anucleates in exponentially growing *recU81* cells was similar to that of the Δ *recU* control (~6 \pm 0.4%; *n*=876 cells). However, in *recU80*, this frequency decreased to ~1.5 \pm 0.1% (*n*=1300 cells) (Fig. 2a). These results suggest that *recU81* cells (RecUF81A) are impaired in HJ resolution, but that *recU80* cells (RecUY80A) might retain some activity *in vivo*.

In naturally competent *B. subtilis* cells, double-stranded DNA (dsDNA) is first bound to the cell surface, where one strand is fragmented and the other strand is transported across the membrane. The recombination proteins associated with the uptake machinery bind and process single-stranded DNA (ssDNA),¹⁹ which has been taken up. There are two modes for the processing of this ssDNA. In one mode, the incoming linear ssDNA recombines, via RecA, with the homologous recipient DNA, generating a donor-recipient heteroduplex (D-loop) recombination intermediate. Then the recombination intermediate is processed by an uncharacterized D-loop resolving enzyme, and the ends are ligated (chromosomal transformation).²¹ In the second option that occurs in the absence of homology with

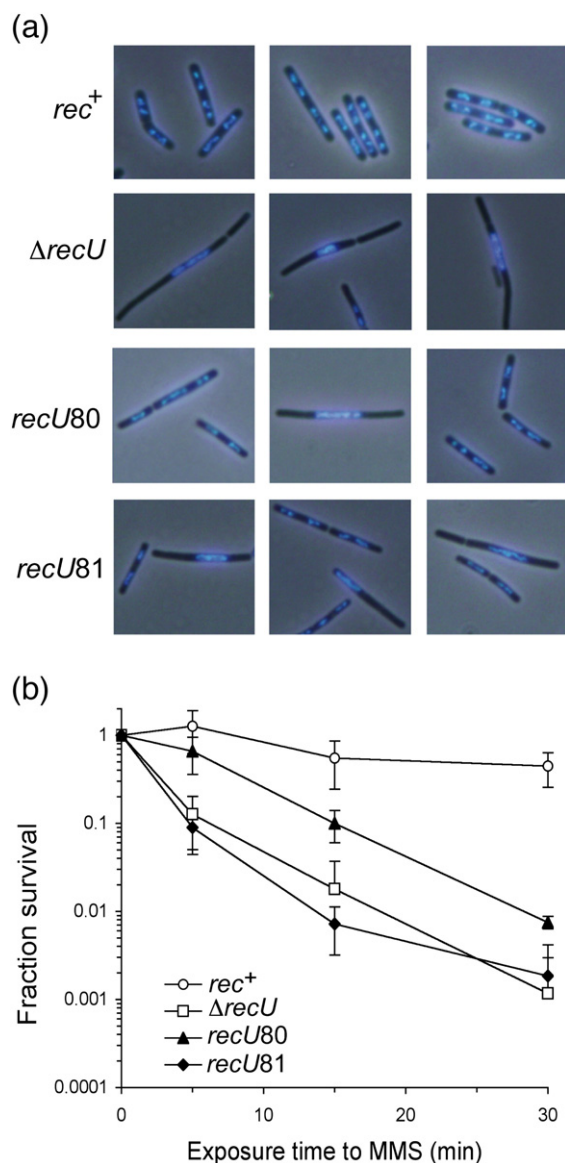


Fig. 2. *In vivo* analysis of the *recU80* and *recU81* mutant strains. (a) DNA segregation phenotype of the *recU80* and *recU81* mutants. Exponentially growing cells ($OD_{560} \sim 0.4$) were stained with DAPI to visualize the nucleoid. Three representative pictures for each RecU variant are shown. (b) Survival studies. Exponentially growing wt, Δ *recU*, *recU80*, and *recU81* cells were incubated with 10 mM MMS, and aliquots were taken at different times to measure the fraction of cells surviving after the addition of the genotoxic agent.

the recipient, a copy of an incoming oligomeric linear plasmid ssDNA anneals with the complementary incoming partner to render a duplex with terminal ssDNA tails. The oligomeric terminal redundant duplex circularizes. Upon ligation, the circular oligomer segregates into monomeric circles (plasmid transformation) in a RecA-independent manner.²² Previously, it was shown that: (i) the frequency of

chromosomal transformation in Δ *ruvAB* or Δ *recU* does not change more than 3-fold, consistent with the observation that the RuvAB–RecU resolvosome cannot process D-loop intermediates; (ii) the frequency of plasmid establishment is reduced ~ 30 -fold in Δ *recU* and 50-fold in *recU71*, which is only impaired in RecA interaction but does not change more than 3-fold in Δ *ruvAB* cells; (iii) the absence of RecA, which itself is not required for plasmid transformation in an otherwise *rec*⁺ background, suppresses the RecU requirement for plasmid transformation, consistent with the observation that RecA exerts a negative effect on plasmid transformation and RecU modulates such RecA activity.^{15,18,19} The effect of the *recU80* or *recU81* mutation on the frequency of chromosomal and plasmid transformation was measured. As with Δ *recU*, *recU80* or *recU81* competent cells were moderately impaired in chromosomal transformation (<3 -fold), whereas plasmid establishment was reduced ~ 50 -fold to 100-fold in the presence of the RecUF81A mutation (*recU81* cells) but was marginally affected by the RecUY80A mutation (*recU80* cells) (Table S2). The absence of RecA overcame the RecUF81A requirement in plasmid transformation (Table S2) and, as expected, the double mutant was still blocked in chromosomal transformation.^{21,23} These data show that the RecUF81A mutation can be impaired not only in HJ resolution but also in RecA modulation, whereas the RecUY80A mutation has a milder phenotype. Whether this RecUY80A mutant is impaired in RecA interaction is not clear from this genetic analysis.

To confirm that *in vivo* RecUY80A might retain some recombinational repair activity, we treated the cells with methylmethane sulfonate (MMS), a DNA-alkylating agent that causes various types of DNA lesions that, if unrepaired, lead to a severe survival defect, as in Δ *recU* cells.²⁴ After the acute exposure of *rec*⁺ cells to 10 mM MMS, their survival was moderately affected (lethal dose to allow 10% survival [LD_{10}], >70 min) (Fig. 2b). The *recU80* mutation rendered cells sensitive to MMS ($LD_{10}=17$ min), but *recU81* cells were very sensitive to 10 mM MMS ($LD_{10}=6$ min) (Fig. 2b). It is likely that the *recU80* mutation (RecUY80A) retains some activity, whereas substitution of residue F81 by A81 (RecUF81A) renders a severely impaired enzyme (Fig. 2b).

RecUY80A and RecUF81A lose structural selectivity for X-shaped structures

To gain insight into the defect(s) observed in *recU80* and *recU81* cells *in vivo*, we purified both RecUY80A and RecUF81A proteins to near homogeneity using a purification protocol similar to the one used for wt RecU.¹⁷ Circular dichroism experiments revealed that the mutant proteins were

folded similarly to the wt protein (Fig. S1a), and protein cross-linking experiments in the presence of increasing NaCl concentrations revealed that the RecUY80A and RecUF81A variants were dimers in solution, as seen with wt RecU (Fig. S1b). Like wt RecU, the RecUY80A and RecUF81A variants were able to interact with the RuvB branch migration translocase (Fig. S2). It is likely, therefore, that both mutant proteins did not suffer a major distortion in their tertiary structure.

In the presence of 1 mM MgCl₂, the HJ adopts a 2-fold-symmetric X-shape (known as a stacked conformation) in which the DNA helices lie anti-parallel with each other.^{3,5,7} Junction resolving enzymes bind to X-shaped HJs with high affinity and selectivity and distort them to perform cleavage. The binding affinity of RecUY80A or RecUF81A for

a synthetic stacked HJ was examined using electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) in the presence of 1 mM MgCl₂ and was compared to ssDNA binding. In the presence of Mg²⁺, RecU specifically binds to HJ DNA (apparent binding constant $K_{dapp}=0.6\pm0.2$ nM; Table S3) with an affinity 250-fold to 500-fold higher than that for a 114-nt-long ssDNA ($K_{dapp}\sim200$ nM).^{15,18,20} Both RecU mutant variants bound X-shaped HJ DNA with very poor structural selectivity, with K_{dapp} values of 50 ± 5 nM (Y80A) and 100 ± 10 nM (F81A) (Fig. 3a; Table S3). RecUY80A and RecUF81A bound ssDNA with similar affinities ($K_{dapp}=\sim350$ and ~400 nM, respectively) and thus only with a 4-fold to 6-fold lower efficiency than that observed with HJ DNA (Table S3). It is likely that RecUY80A or RecUF81A lost selectivity for HJ DNA, and that the

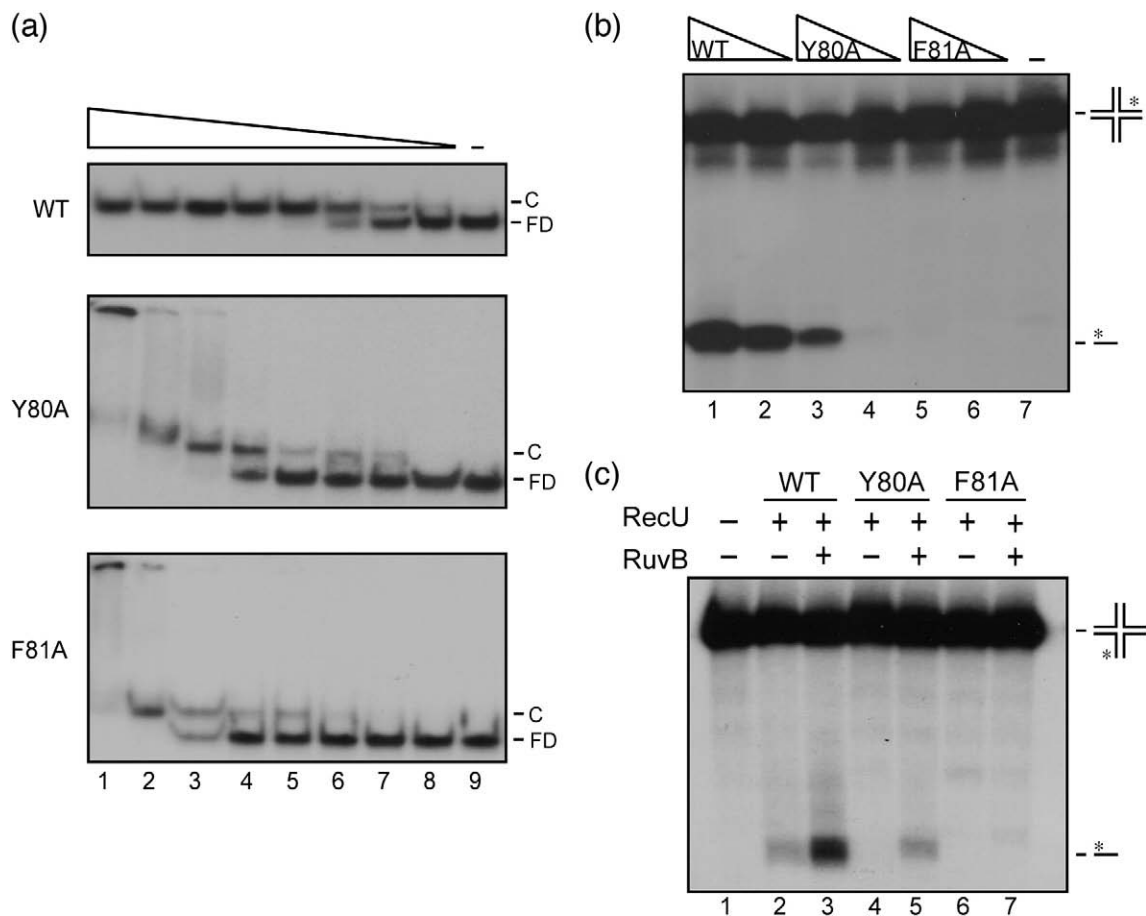


Fig. 3. HJ binding and cleavage activity of RecUY80A and RecUF81A. (a) Increasing amounts of proteins (RecU: 32, 16, 8, 6, 3, 1.5, 0.75, and 0.25 nM; RecUY80A and RecUF81A: 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6, and 3 nM) were incubated with radioactively labeled HJ DNA for 15 min at 37 °C in the presence of 1 mM Mg²⁺. Complexes were visualized using 6% native PAGE and autoradiography. FD, free DNA; C, protein-DNA complex. (b) Cleavage of the synthetic junction J3, labeled at arm 4. Reaction mixtures containing J3 HJ DNA were incubated with 300 or 100 nM RecU variants for 30 min at 37 °C in buffer B containing 10 mM Mg²⁺. The products of the cleavage reaction were analyzed by 15% dPAGE. (c) Cleavage activity of RecU variants in the presence of RuvB. J3 DNA (labeled in arm 2) was incubated with RecU variants (300 nM) and RuvB (40 nM) in buffer B containing 10 mM MgCl₂ and 1 mM ATPγS for 30 min at 37 °C, and the cleavage products were analyzed by 20% dPAGE and autoradiography.

low-mobility complexes observed with X-shaped HJ DNA at 400 nM protein correlated with nonspecific DNA binding. Binding to the ssDNA of the RecU variants is also only 2-fold lower than the affinity of wt for ssDNA, suggesting that nonspecific binding is only marginally affected, if at all.

RecUY80A cleaves HJs but RecUF81A fails to cleave HJs

To address whether the catalytic residues are located at the proper place for cleavage once the HJ is bound by these mutants, we performed cleavage assays in the presence of 10 mM MgCl₂. As shown in Fig. 3b, RecUY80A, which was less impaired *in vivo* and showed poor HJ binding, cleaved them at the proper position. In contrast, RecUF81A was unable to cleave the HJ. Experiments were also performed at higher protein concentrations (1 μM) with identical results (data not shown).

Addition of RuvB, in the ATPγS-bound form (RuvB-ATPγS), significantly stimulates the RecU-mediated HJ cleavage of some HJs by a direct RecU-RuvB interaction.¹⁵ We performed cleavage assays in the presence of RuvB-ATPγS. It stimulated RecUY80A HJ cleavage, whereas RecUF81A was still unable to cleave the HJ under similar conditions (Fig. 3c). Since both RecU variants interact with RuvB (Fig. S2), we assume that RecUF81A does not generate the productive HJ-RecU complex; thus, in those complexes, the cleavage reaction cannot take place, even in the presence of RuvB.

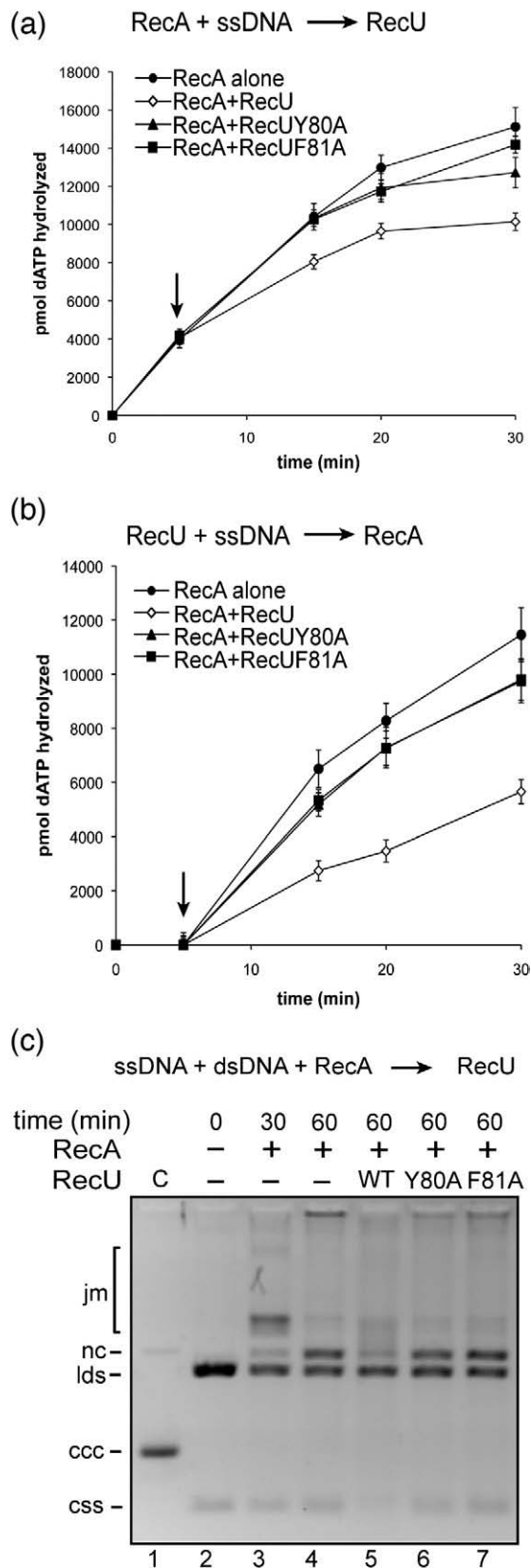
RecUY80A is not able to distort the HJ, and RecUF81A forms less stable complexes

Recognition and distortion of the anti-parallel X-structure are two critical steps for the cleavage of HJs in the presence of Mg²⁺.^{5,7} In our HJ-RecU complex, we proposed a rearrangement of the stacked HJ such that the center of the HJ is opened up and the stalk penetrates. This could be achieved through the junction adopting a more 4-fold-symmetric form (see Fig. 1c). To understand the inability of RecUF81A to cleave HJs and to test if Y80 or F81 is involved in base unstacking and junction opening, we performed global conformation assays with the six species of two short-arm and two long-arm junctions generated by digestion of J3, as described previously.^{6,25} As already published, in the presence of Mg²⁺ or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), upon RecU binding, the junctions adopt a slow-fast-slow-slow-fast-slow pattern similar to the one observed for the junctions alone in the presence of EDTA (Fig. S3).⁶ At the protein concentration tested, RecUY80A distorted the HJ with low efficiency in the presence of a MgCl₂ concentration optimal for HJ cleavage,¹⁷ and RecUF81A shows two patterns of mobility that are

not observed with the wt (Fig. S3a). The nature of the complexes in these two patterns remains unknown, but they do not seem to correspond to a mixture of monomers and dimers of RecUF81A bound to the junctions because, in both cases, the pattern of mobility corresponds to the binding to a square planar structure. This arrangement is difficult to envision if only one monomer of RecUF81A is bound to the HJ, and protein cross-linking suggests that RecUF81A is able to dimerize like wt RecU under high-salt conditions (see Fig. S1). However, the possibility that both mutants show a less stable and less specific binding to the HJ DNA, with RecUF81A dimers assembling on opposing junction arms with a resultant open but unproductive HJ conformation, cannot be ruled out. RecUY80A binding does show an altered pattern relative to wt, and since it retains reduced HJ resolving activity, this may fit with an inability to properly open the HJ for resolution. Previously, we had observed the stabilization of RecUΔ1-32-HJ complexes in EMSA due to the cage effect of PAGE, which was not observed in filter binding assays.¹⁴ Therefore, protein-HJ complex stability was measured in filter binding assays. In the presence of Mg²⁺, the binding was very poor and could only be detected at high protein concentrations (400 nM; data not shown). In the presence of EDTA, we could measure the stability and could demonstrate that RecUF81A forms less stable complexes (half-life of 10 min) than the wt protein (half-life longer than 16 min; Table S3). Taken together, these results suggest that by mutating F81 to A81, we lost both the specificity for recognition and the ability to distort a stacked X-shaped HJ appropriately.

RecUY80A and RecUF81A do not interact with RecA *in vitro*

Previously, it was shown that RecU modulates RecA activities by promoting RecA-catalyzed strand invasion and by inhibiting RecA-mediated ssDNA-dependent dATP hydrolysis and strand exchange.^{15,18} dATP hydrolysis by RecA correlates with the amount of RecA bound to ssDNA under most conditions.^{26,27} Recently, mutated variants of two residues (K56A and R71A; Fig. 1b), which are also located in the stalk region of RecU, were shown to be proficient for HJ cleavage but impaired for RecA modulation.¹⁵ To gain insight into the effect of RecUY80A or RecUF81A on RecA, we measured the hydrolysis of dATP by RecA in the presence of the two RecU variants (Fig. 5). Independently of the order of addition of both proteins RecA and RecU, ssDNA-dependent dATP hydrolysis by RecA was inhibited by wt RecU.^{15,18} However, both RecUY80A and RecUF81A failed to exert a negative effect on the nucleation of RecA onto ssDNA by not affecting the RecA dATPase activity (Fig. 4a and b).



The effect of RecU variants on RecA-mediated dATP-dependent DNA strand exchange was also analyzed. As previously reported, addition of RecU inhibited the accumulation of RecA-mediated final recombination products (nicked circular DNA) between a circular ssDNA and its homologous linear dsDNA, leading to the accumulation of joint molecules.^{15,18} The RecUY80A or RecUF81A variant did not inhibit the RecA-mediated accumulation of final recombination products (nicked circular DNA, Fig. 4c).

RecU, when bound to HJ DNA, does not interact with RecA

RecUF81A and, to a lesser extent, RecUY80A are affected in HJ recognition and HJ distortion, and they are also impaired in interaction with RecA *in vitro*. These results suggest that the stalk region is involved both in HJ recognition and distortion as well as in interaction with RecA, and both activities might be mutually exclusive (see Fig. 1c). Thus, wt RecU—upon binding and distorting an HJ, with its stalk region penetrating into the open center of a square planar junction (see Fig. 1c)—might be unable to exert a negative effect on RecA activities. If the working model of the HJ-RecU complex is correct, RecU interaction with HJ DNA might hinder interaction with RecA. To test this hypothesis, we performed dATPase assays in the presence of ssDNA and HJ DNA (Fig. 5). The results show that once RecU was bound to the HJ DNA, it was not able to inhibit RecA-mediated dATP hydrolysis.

Fig. 4. RecUY80A or RecUF81A fails to interact with RecA. RecUY80A or RecUF81A does not inhibit RecA-catalyzed dATP hydrolysis (a and b). Circular pGEM-3Zf(+) ssDNA (10 μ M in nucleotides) was preincubated with RecA [1.3 μ M; in (a)] or RecU variants [200 nM; in (b)] in buffer B containing 2 mM dATP for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. Then the second protein was added at the same concentrations, and the reaction mixtures were incubated for a further 25 min at 37 $^{\circ}$ C. Aliquots were taken at different times, and the extent of the RecA-catalyzed hydrolysis of dATP was quantified. The arrow indicates the addition of the second protein. Values are averages of four independent experiments. Error bars represent standard deviations. (c) RecUY80A and RecUF81A do not inhibit RecA-mediated DNA strand exchange. Circular pGEM-3Zf(+) ssDNA (10 μ M in nucleotides) and homologous KpnI-linearized dsDNA (20 μ M in nucleotides) were incubated with a constant amount of RecA (1.3 μ M) for 30 min. Then RecU variants were added at 200 nM, and the reaction mixtures were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. The products of the reaction were deproteinized and separated by 0.8% agarose gel electrophoresis. In lane 3, the reaction was stopped at 30 min, just before the addition of the RecU protein. C, partially nicked dsDNA; css, circular ssDNA; ccc, covalently closed circular DNA; lds, linear dsDNA; nc, nicked circular DNA; jm, joint molecules.

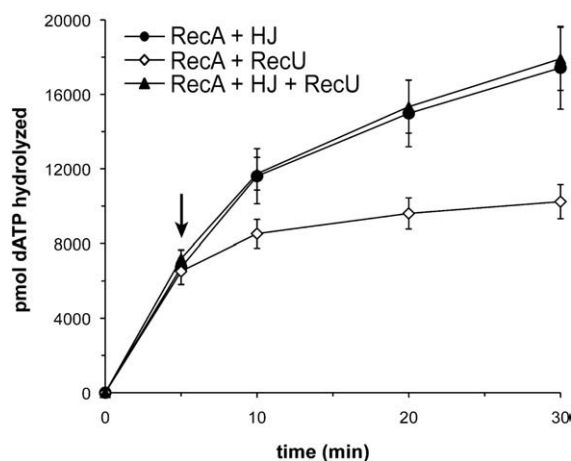


Fig. 5. RecU does not modulate RecA when it is bound to the HJ. Circular ssDNA (10 μ M in nucleotides) and HJ DNA (200 μ M in nucleotides) were incubated with RecA (1.3 μ M) in buffer B containing 2 mM dATP for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. Then RecU (200 nM) was added, and the reaction mixtures were incubated for a further 25 min at 37 $^{\circ}$ C (triangles). Aliquots were taken, and the extent of the RecA-catalyzed hydrolysis of dATP is shown. The arrow indicates the addition of RecU. Control reactions were performed by omitting HJ DNA (diamonds) or RecU (circles). Values are averages of three independent experiments. Error bars represent standard deviations.

Furthermore, increasing amounts of RecA did not interfere with RecU binding of HJs (data not shown).

Discussion

RecU protein has two activities: to modulate RecA activities and to recognize, distort, and cleave HJs. The first activity is believed to be required for the mediation of RecA activities, especially for modulating the negative effect exerted by RecA on linear plasmid ssDNA during plasmid transformation.^{15,19} This is consistent with the observations that both RecA and RecU localize at the pole that contains the competence machinery, and that RecU recruits RecA to sites of DNA damage but not to sites on DNA where HR would be deleterious.^{19,28} The second activity of RecU is essential for the *in vivo* resolution of HJ recombination intermediates in the absence of chromatin cohesion¹⁶ or a branch migration translocase.^{8,29} However, how RecU specifically recognizes and distorts its target and the interplay, if any, between both RecU activities has not been demonstrated. RecU belongs to the nuclease superfamily of HJ resolving enzymes, which show structural homology with type II restriction enzymes.⁷ The RecU structure shows a mushroom-like appearance, with a cap (similar to the structures seen for archaeal and T7 Endo I resolving enzymes) but also with a stalk region (not present in archaeal

and viral enzymes; see [Introduction](#)). Recently, the structures of T7 Endo I and T4 Endo VII enzymes, in complexes with synthetic four-way DNA junctions, have been determined.^{11,30} These viral enzymes cleave a variety of branched structures,^{11,30} whereas RecU and the other bacterial HJ resolving enzymes are highly selective for the cleavage of HJ DNA.⁷ Although T7 Endo I and RecU belong to the same superfamily, the structure of the T7 Endo I-HJ complex shows that the pairs of DNA helical arms are essentially coaxial,¹¹ whereas the global conformation assays performed with RecU show that the RecU-HJ complex adopts a square planar structure ([Fig. S3](#)).

The mutants described in this study, which map in the stalk region, support the model of how RecU-like resolvases, which have an extra stalk region not present in other resolvases, recognize and bind HJ DNA. The substitution of two aromatic residues in the RecU stalk region (Y80 and F81) by alanine resulted in no or only poorly specific recognition of the X-shaped HJ by the variant proteins. The wt RecU protein shows structural selectivity for HJ DNA, but the RecUY80A or RecUF81A variants bound HJ DNA with only a 2-fold to 4-fold discrimination factor when compared to other DNA substrates. RecUF81A is not able to cleave HJs, whereas RecUY80A, which binds and distorts the HJ with poor efficiency, is still able to cleave HJs inefficiently. Our hypothesis is that the types of interactions formed by these two residues with the HJ are distinctly different, although both are relatively critical. Tyrosines such as Y80 are often regarded as having a strong hydrophilic 'character' by virtue of the hydroxyl group attached to the phenyl ring and may therefore be interacting with the phosphate backbone. Phenylalanines with their phenyl ring side chains are hydrophobic; from our modeling, F81 could be nicely stacked against a nucleobase in the DNA, as proposed for the structurally unrelated *E. coli* RuvC³¹ and as observed in other DNA-protein complexes.³² Thus, the stacking of F81 may be more important than any Y80 polar interaction to the backbone for obtaining the right alignment of the phosphate backbone at the active site (although Y80 may be doing a bit of both, i.e., some stacking as well). The interaction of Y80 with the phosphate backbone seems to be necessary for both establishment of the first contact with the HJ DNA and possible disruption of base-pairing because Y80A poorly distorts an HJ upon binding.

The importance of aromatic residues in the specific recognition of the HJ has not been analyzed in mutation studies with other HJ resolving enzymes of the nuclease superfamily and is not observed in the crystal structure of the HJ-T7 Endo I complex.¹¹ The crystal structure of the T7 Endo I-HJ DNA complex shows that the interaction between protein and HJ DNA is mediated by

numerous hydrogen bonds, often involving charged amino acids.¹¹ T7 Endo I interacts exclusively with the backbone of the DNA and makes no hydrogen bonds with the bases. The only residue that seems to penetrate into the bases is Leu69. The side chain of Leu69 projects into the hydrophobic core formed by two stacked bases. However, we believe that these interactions cannot be extrapolated to other members of the nuclease superfamily because there are clear differences in binding to and cleavage of HJs with the other members. The T7 Endo I-HJ DNA complex does not adopt the square planar HJ conformation, whereas RecU cleavage seems to be restricted to HJ DNA. In the crystal structure of T4 Endo VII, the only amino acids that seem to penetrate into the junction are positively charged residues (Lys, Arg, and His). Their interactions are solely with the DNA backbone, explaining the lack of sequence specificity in Endo VII cleavage.³⁰ The bacterial HJ resolving enzymes, such as RecU or *E. coli* RuvC, do have some sequence specificity.^{20,33} Related to this, it has been reported that residue Phe69 in RuvC, which belongs to the integrase family of HJ resolving enzymes and also shows specific cleavage of HJs, is involved in HJ binding.³¹ The authors suggested that this residue contributes substantially to the disruption of the base-pairing of the stacked structure in the RuvC-HJ DNA complex, which is a necessary prior step toward DNA cleavage.³¹ It seems likely that both bacterial HJ resolvases, although belonging to different superfamilies, might recognize and cleave HJs by a conserved mechanism.

The HJ resolving enzymes of the RecU superfamily, RecU and *Pyrococcus furiosus* Hjc (Hjc_{Pfu}), have been found to interact with RecA and RadB [a RadA (archaeal RecA homolog) mediator], respectively.^{15,18,34} Furthermore, the eukaryotic Rad51 mediators Rad51C and XRCC3 are also required for the resolution of HJs in mammalian cells.³⁵ The *P. furiosus* RadA-mediator RadB (RadB_{Pfu}) coprecipitated with Hjc_{Pfu}. The HJ cleavage activity of Hjc_{Pfu} is inhibited by RadB_{Pfu} in the absence, but not in the presence, of ATP.³⁴ RecA and RecU interact even in the absence of dATP, and the latter modulates RecA.^{15,18} The results shown in this work suggest the following: (i) once the RecU-HJ complex is formed, RecU does not interact with RecA; and (ii) the regions involved in RecA modulation and in HJ recognition and distortion might overlap. RecUR71A,¹⁵ RecUY80A, and RecUF81A were not able to interact with RecA. It is likely that RecA modulation and HJ resolution are exclusive activities. RecU has a higher affinity for HJ DNA than for RecA because RecU binds HJ DNA even in an excess of RecA (data not shown), whereas RecU does not modulate RecA in the presence of HJ

DNA (Fig. 5). Whether this division of labor (RecA modulation or HJ resolution) by free or HJ-DNA-bound RecU can be extrapolated to other HJ resolving enzymes of the same superfamily (e.g., archaeal HJ resolvases) remains to be analyzed.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids, and *in vivo* studies

The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table S1. The wt sequence at residue 80 or 81 was substituted with alanine by site-directed mutagenesis with the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene) using a pHP13 derivative containing wt recU (pRecU⁺) as template DNA. The presence of only the expected mutation was established by nucleotide sequencing. The pHP13-borne *recU80* and *recU81* derivatives obtained were transformed into BG855 (Δ recU) or BG651 (Δ recU Δ recA) cells to analyze the frequency of anucleates, the survival of strains after exposure to 10 mM MMS, and their transformation potential.

Exponentially growing BG214 (rec⁺) and its isogenic derivatives BG855 (Δ recU), BG1195 (*recU80*), and BG1197 (*recU81*) were grown to an OD₅₆₀ of ~0.4 and stained with DAPI or exposed to MMS for variable times. Serial dilutions were plated to measure survival rates, as described previously.³⁶

Competent *B. subtilis* cells³⁷ were transformed with SB19 prototrophic chromosomal DNA or pUB110 plasmid DNA. The yield of met⁺ (chromosomal transformation) or kanamycin-resistant (Km^R) transformants (plasmid transformation) was corrected for DNA uptake, and the values obtained were normalized relative to that of the rec⁺ strain, which is taken as 1.³⁶

Protein manipulations

pCB568-borne *recU* gene, pCB693-borne *recU80* gene, and pCB694-borne *recU81* gene, under the control of a T7 promoter, were used to overexpress RecU, RecUY80A, and RecUF81A proteins in *E. coli* BL21(DE3)[pLysS] cells, respectively. pBT61-borne *recA* gene or pCB737-borne *ruvB* gene was used to overexpress RecA or RuvB in BG214 cells, respectively.¹⁴ RecU variants were purified by a protocol developed for RecU,²⁰ and concentrations are expressed as moles of dimers. Circular dichroism spectra revealed that the proportion of α -helices and β -sheets in wt RecU was similar to that of the variant proteins (Fig. S1a). RuvB and RecA were purified as previously described,¹⁵ and their concentrations are expressed as hexamers or monomers, respectively.

Protein cross-linking was used to study RecU dimerization and protein-protein interactions, as described previously.¹⁵ A constant amount of protein was mixed in buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 μ g/ml bovine serum albumin, 1 mM DTT, and 5% glycerol] containing NaCl and MgCl₂, as indicated. bis(*N*-Hydroxysuccinimide ester) disuccinimidyl substrate was added to a final concentration of 125 μ M. After incubation for 10 min at 37 °C, the reactions were stopped by addition of stop

buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 400 mM glycine, 3% β -mercaptoethanol, 2% SDS, and 10% glycerol] and submitted to SDS-PAGE, followed by Western blot analysis. Rabbit polyclonal anti-RecU antibody was obtained using standard techniques. Commercially available monoclonal anti-His antibody was used to detect C-terminal His-tagged RuvB.

Standard HJ binding and cleavage assays

EMSAs were used to measure the binding of the variant proteins to different types of DNA substrates. RecU binding to the HJ DNA was assayed using [γ - 32 P]-labeled J3 junction DNA (0.3 μ M in moles of nucleotides)²⁵ in buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.05 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM DTT, and 5% glycerol] containing 1 mM MgCl₂ or 1 mM EDTA. After 15 min of incubation at 37 °C, the complexes were separated by 6% PAGE and visualized by autoradiography. Cleavage of HJ J3, labeled on the indicated strand, was assayed for 30 min at 37 °C in buffer B containing 10 mM MgCl₂, and cleavage products were analyzed by 15% denaturing PAGE (dPAGE), as described previously.²⁰

Comparative gel electrophoresis of RecU-HJ3 complexes

Each arm of HJ3 carries a site for restriction by either BamHI (B), EcoRI (R), HindIII (H), or XbaI (X).²⁵ Purified junction DNA was digested with the appropriate pairwise combination of restriction enzymes and directly used. The protein concentrations were 3 nM (wt RecU) and 75 nM (RecU mutants). For analysis in the presence of Mg²⁺, the binding reactions contained 1 mM (wt RecU) or 10 mM MgCl₂ (RecU mutants). After 15 min of incubation at 37 °C, the samples were loaded on 8% acrylamide gels. Gels and buffers contained either 1 mM EDTA or 200 μ M MgCl₂. Electrophoresis was carried out at 90 V for 16 h at 4 °C.

Filter binding assays

The stability of the complexes with an HJ was essentially performed as described previously.³⁸ [γ - 32 P] HJ J3 DNA was incubated with RecU (20 nM) or RecU mutants (400 nM) in 20 μ l of buffer B containing 1 mM EDTA for 15 min at 37 °C. Samples were taken at various time points and filtered on alkali-treated filters (HAWP type, 0.45 μ m; Millipore), and the amount of DNA retained on the filter was quantified.

dATP hydrolysis and DNA strand-exchange assays

Circular ssDNA (10 μ M in nucleotides) was preincubated with RecA (1.3 μ M) or RecU variants (200 nM) and 2 mM dATP ([α - 32 P]dATP, 1:500,000 ratio) for 5 min at 37 °C in buffer B containing 10 mM MgOAc₂. Then the second protein was added, and incubation continued for 25 min. The extent of dATP hydrolysis at different times was quantified by thin-layer chromatography, as described previously.³⁹ When indicated, HJ DNA (200 μ M

in nucleotides) was also added at the same time as ssDNA.

The strand-exchange reactions were essentially performed as follows: circular pGEM-3Zf(+) ssDNA (10 μ M) and linearized homologous KpnI dsDNA (20 μ M) were incubated with a constant amount of RecA (1.3 μ M) in buffer B containing 10 mM MgOAc₂ and 2 mM dATP for 30 min at 37 °C. Then RecU variants were added at 200 nM, and the reaction mixture was incubated for 30 min at 37 °C. The products of the reaction were deproteinized and separated by 0.8% agarose gel electrophoresis, as described previously.⁴⁰ *B. subtilis* RecA preferentially hydrolyzes dATP over ATP and supports an efficient DNA strand-exchange reaction in the presence of dATP when compared to ATP.⁴¹

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jmb.2011.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.05.008)

Acknowledgements

This work was partially supported by grants BFU2009-07167 and CSD2007-00010 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) to J.C.A., grant BFU2009-09520 from MICINN to S.A., and grant BB/E017576/1 from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council to J.B.R. C.C. and E.G.-T. were recipients of a fellowship (BFU2006-01062 and AP2006-0134 from MICINN, respectively). We thank J. Gómez-Gutiérrez for helping us with circular dichroism experiments.

References

- Holliday, R. (1964). The induction of mitotic recombination by mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, **50**, 323–335.
- West, S. C. (1994). The processing of recombination intermediates: mechanistic insights from studies of bacterial proteins. *Cell*, **76**, 9–15.
- Lilley, D. M. & White, M. F. (2000). Resolving the relationships of resolving enzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 9351–9353.
- Aravind, L., Makarova, K. S. & Koonin, E. V. (2000). Survey and summary: Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3417–3432.
- West, S. C. (2009). The search for a human Holliday junction resolvase. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 519–526.
- McGregor, N., Ayora, S., Sedelnikova, S., Carrasco, B., Alonso, J. C., Thaw, P. & Rafferty, J. (2005). The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure*, **13**, 1341–1351.
- Declais, A. C. & Lilley, D. M. (2008). New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 86–95.
- Sanchez, H., Kidane, D., Reed, P., Curtis, F. A., Cozar, M. C., Graumann, P. L. *et al.* (2005). The RuvAB branch

- migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics*, **171**, 873–883.
9. Bond, C. S., Kvaratskhelia, M., Richard, D., White, M. F. & Hunter, W. N. (2001). Structure of Hjc, a Holliday junction resolvase, from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 5509–5514.
 10. Nishino, T., Komori, K., Tsuchiya, D., Ishino, Y. & Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the archaeal Holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition. *Structure*, **9**, 197–204.
 11. Hadden, J. M., Declais, A. C., Carr, S. B., Lilley, D. M. & Phillips, S. E. (2007). The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I. *Nature*, **449**, 621–624.
 12. Kelly, S. J., Li, J., Setlow, P. & Jedrzejas, M. J. (2007). Structure, flexibility, and mechanism of the *Bacillus stearothermophilus* RecU Holliday junction resolvase. *Proteins*, **68**, 961–971.
 13. Osipiuk, J., Li, H., Moy, S., Collart, F. & Joachimiak, A. (2004). X-ray crystal structure of penicillin-binding protein-related factor A from *Bacillus stearothermophilus* protein. Protein Data Bank ID: 1Y1O, DOI: 10.2210/pdb1y1o/pdb.
 14. Carrasco, B., Canas, C., Sharples, G. J., Alonso, J. C. & Ayora, S. (2009). The N-terminal region of the RecU Holliday junction resolvase is essential for homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **390**, 1–9.
 15. Cañas, C., Carrasco, B., Ayora, S. & Alonso, J. C. (2008). The RecU Holliday junction resolvase acts at early stages of homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5242–5249.
 16. Pedersen, L. B. & Setlow, P. (2000). Penicillin-binding protein-related factor A is required for proper chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 1650–1658.
 17. Carrasco, B., Cozar, M. C., Lurz, R., Alonso, J. C. & Ayora, S. (2004). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.* **186**, 5557–5566.
 18. Carrasco, B., Ayora, S., Lurz, R. & Alonso, J. C. (2005). *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3942–3952.
 19. Kidane, D., Carrasco, B., Manfredi, C., Rothmaier, K., Ayora, S., Tadesse, S. *et al.* (2009). Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS Genet.* **5**, e1000630.
 20. Ayora, S., Carrasco, B., Doncel, E., Lurz, R. & Alonso, J. C. (2004). *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 452–457.
 21. Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R., Scher, B. & Cirigliano, C. (1973). Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **114**, 273–286.
 22. Canosi, U., Iglesias, A. & Trautner, T. A. (1981). Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: effects of insertion of *Bacillus subtilis* DNA into plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 434–440.
 23. Ceglowski, P., Luder, G. & Alonso, J. C. (1990). Genetic analysis of *recE* activities in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 441–445.
 24. Fernandez, S., Sorokin, A. & Alonso, J. C. (1998). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effects of *recU* and *recS* mutations on DNA repair and homologous recombination. *J. Bacteriol.* **180**, 3405–3409.
 25. Duckett, D. R., Murchie, A. I., Diekmann, S., von Kitzing, E., Kemper, B. & Lilley, D. M. (1988). The structure of the Holliday junction, and its resolution. *Cell*, **55**, 79–89.
 26. Cox, M. M. (2007). Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 127–138.
 27. Galletto, R. & Kowalczykowski, S. C. (2007). RecA. *Curr. Biol.* **17**, R395–R397.
 28. Kidane, D. & Graumann, P. L. (2005). Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell*, **122**, 73–84.
 29. Sanchez, H., Carrasco, B., Cozar, M. C. & Alonso, J. C. (2007). *Bacillus subtilis* RecG branch migration translocase is required for DNA repair and chromosomal segregation. *Mol. Microbiol.* **65**, 920–935.
 30. Biertumpfel, C., Yang, W. & Suck, D. (2007). Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction. *Nature*, **449**, 616–620.
 31. Macmaster, R., Sedelnikova, S., Baker, P. J., Bolt, E. L., Lloyd, R. G. & Rafferty, J. B. (2006). RusA Holliday junction resolvase: DNA complex structure—insights into selectivity and specificity. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5577–5584.
 32. Yoshikawa, M., Iwasaki, H. & Shinagawa, H. (2001). Evidence that phenylalanine 69 in *Escherichia coli* RuvC resolvase forms a stacking interaction during binding and destabilization of a Holliday junction DNA substrate. *J. Biol. Chem.* **276**, 10432–10436.
 33. Baker, C. M. & Grant, G. H. (2007). Role of aromatic amino acids in protein–nucleic acid recognition. *Biopolymers*, **85**, 456–470.
 34. Bennett, R. J., Dunderdale, H. J. & West, S. C. (1993). Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion. *Cell*, **74**, 1021–1031.
 35. Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I. K. *et al.* (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 33782–33790.
 36. Liu, Y., Masson, J. Y., Shah, R., O'Regan, P. & West, S. C. (2004). RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*, **303**, 243–246.
 37. Alonso, J. C., Tailor, R. H. & Luder, G. (1988). Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 3001–3007.
 38. Rottlander, E. & Trautner, T. A. (1970). Genetic and transfection studies with *B. subtilis* phage SP50: I. Phage mutants with restricted growth on *B. subtilis* strain 168. *Mol. Gen. Genet.* **108**, 47–60.
 39. Ayora, S. & Alonso, J. C. (1997). Purification and characterization of the RecF protein from *Bacillus subtilis* 168. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2766–2772.
 40. Mesa, P., Alonso, J. C. & Ayora, S. (2006). *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 G40P helicase lacking the N-terminal domain unwinds DNA bidirectionally. *J. Mol. Biol.* **357**, 1077–1088.
 41. Carrasco, B., Manfredi, C., Ayora, S. & Alonso, J. C. (2008). *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amsterdam)*, **7**, 990–996.